

발간등록번호

11-1543000-002237-01

Chromatin architecture 조절 기술을 통한 다수성 콩 형질 전환체 개발 최종보고서

2018. 03. 23.

주관연구기관 / 제노마인(주)

협동연구기관 / 동아대학교

농 립 축 산 식 품 부
농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

‘Chromatin architecture 조절기술을 통한 다수성 콩 형질전환체 개발’(연구개발기간 : 2012. 12. 21 ~ 2017. 12. 20)과제의 최종보고서 1부를 제출합니다.

2018. 03. 23.

주관연구기관명 :	제노마인(주)	(대표자)	김 동 수	(인)
협동연구기관명 :	동아대학교	(대표자)	이 재 열	(인)
참여기관명 :		(대표자)		(인)

주관연구책임자 : 이 동 희

협동연구책임자 : 정 영 수

참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	112124-5	해당단계 연구기간	2012.12.21. - 2017.12.20. (5년)	단계구분	1단계
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부 과제명	Chromatin architecture 조절기술을 통한 다수성 콩 형질전환체 개발			
연구책임자	이동희	해당단계 참여 연구원 수	총: 79명 내부: 명 외부: 79명	해당단계 연구개발비	정부: 1,400,000천원 민간: 470,000천원 계: 1,870,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 79명 내부: 명 외부: 79명	총 연구개발비	정부: 1,400,000천원 민간: 470,000천원 계: 1,870,000천원
연구기관명 및 소속부서명	제노마인(주)			참여기업명	

※ 국내·외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 과제
-------------------------	-------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	√	√									

요약

우리는 확보하고 있는 유용 유전자 중 생산성 증대의 표현형적 특징을 가지는 4종의 유전자와 homology approach를 통하여 발굴된 신규 유용 유전자 14종도 콩 형질전환체 개발에 적용하였다. 신규 발굴된 chromatin architecture 조절관련 유전자는 *AHL17*, *AHL22*, *MtATPG1*, *MtATPG2*, 그리고 *GmATPGs* 9종으로 이들 모두는 생산성 증대와 녹기 연장의 표현형적 특징을 제공하였다. 또한 우리는 기능성 유전체 연구를 통해 신규 발굴한 *AMTG1* 유전자도 생산성 증대에 대한 표현형적 특징을 제공함을 확인할 수 있었다.

우리는 상기 유전자를 고효율 콩 형질전환 시스템을 통하여 형질전환체를 생산하였다. 유전자 도입/발현 분석 등의 기능 분석을 통하여 선별된 형질전환체는 GM 포장에서 세대 전개를 통하여 다수성 농업형질을 가지는 우수계통으로 선별·육성하였다. GM 포장에서 3~4차 세대전개를 통하여 우리는 135% 이상의 다수성 농업형질을 가지는 계통을 우수계통으로 선별하였고, 선별된 우수계통은 9계통이었다.

보고서 면수: 180

4. 국문 요약문

		코드번호	D-01
<p style="text-align: center;">연구의 목적 및 내용</p>	<p>연구개발의 최종 목적은 전 세계 주요작물 중 하나인 콩에 chromatin architecture 조절을 통한 다수성 목표 형질이 발현되는 유용 유전자를 도입하여 다수성에 대한 우량 형질을 가지는 콩 형질전환체를 개발하여 다수성 농업 형질에 대한 우량 콩 품종 생산 기반을 마련하는 것이다.</p> <p>이를 위하여 본 과제에서는 다음의 연구개발 목표를 달성하고자 한다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 모델식물인 <i>Arabidopsis</i>에서 유용성이 검증된 chromatin architecture 조절 유전자(AT-hook domain을 가지는 유전자로 노화시기에 chromatin의 안정성을 제공하여 다수성 목표형질을 가짐) 4종을 기 확립된 형질전환 기술을 이용하여 콩에 도입하고, 2) 또한 chromatin architecture 조절을 통한 다수성 목표형질을 지닌 유용 유전자 6종을 새로이 발굴·분리하여 콩에 도입하고자 한다(총 10종의 형질전환체 생산). 3) 생산된 콩 형질전환체 7종 이상을 대상으로 다수성 목표형질에 대한 기능분석을 실시하여 2종의 다수성 목표형질을 지닌 우량 콩 형질전환체를 개발하고, 4) 개발된 우량 형질전환체를 포장시험을 통하여 다수성 농업 형질($\geq 120\%$ 종자수확량)을 지닌 우량 콩 품종 개발에 적용하고자 한다(2종). 5) 개발된 우량 형질전환체에 대한 품종 개발은 추후 GM 작물 실용화 연구를 통하여 추진하며 본 사업동안의 추진 단계는 형질전환체 개발까지를 수행한다. 		
<p style="text-align: center;">연구개발성과</p>	<p>가. 연구 결과</p> <p>우리는 확보하고 있는 유용 유전자 중 생산성 증대와 노화 지연의 표현형적 특징을 가지는 <i>ATPG3</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i>, 그리고 <i>ATPG8</i>과 기능성 유전체 연구 혹은 homology approach를 통하여 발굴된 신규 유용 유전자 14종도 콩 형질전환체 개발에 적용하였다.</p> <p>애기장대의 chromatin architecture 조절관련 유전자에 대한 homology approach를 통하여 애기장대에서 <i>AHL17</i>과 <i>AHL22</i>, <i>Medicago truncatula</i>에서 <i>MtATPG1</i>과 <i>MtATPG2</i>, 그리고 콩에서 <i>GmATPGs</i> 9종을 신규 발굴하였으며, 이들 모두는 생산성 증대와 녹기 연장의 표현형적 특징을 제공하였다. 그리고 흥미로운 점은 이러한 유전자들은 그들의 발현 정도에 따라 생산성 증대 그리고/혹은 녹기 연장의 형질을 제공한다는 것이다. 이러한 기술을 통한 생산성 증대는 야생형과 비슷한 수확시기를 가진다는 점에서 본 기술이 생산성 증대에 대한 형질 제공에 있어 아주 강력할 것으로 판단된다. 한편 기능성 유전체 연구를 통해 신규 발굴한 <i>AMTG1</i> 유전자도 생산성 증대에 대한 표현형적 특징을 제공함을 확인할 수 있었다.</p> <p>우리는 상기 유전자를 pB2GW7.0 벡터와 pCSENIIF 벡터를 이용한 고효율 콩 형질전환 시스템을 통하여 형질전환체를 생산하였다. 이후 8종의 유전자에 대한 형질전환체의 유전자 도입/발현 분석 등의 기능 분석을 통하여 선별된 형질전환체에서 생산성 증대 농업형질을 나타내는 형질전환체를 선별하였다.</p>		

선별된 형질전환체는 GM 포장에서 세대 전개를 통하여 우수계통을 선별·육성하였다. GM 포장에서 3~4차 세대전개를 통하여 우리는 120% 이상의 다수성 농업형질을 가지는 17계통을 개발하였으며, 이중 135% 이상의 다수성 농업형질을 가지는 계통을 우수계통으로 선별하였고, 선별된 우수계통은 9계통이었다. 본 연구팀은 선별된 우수계통에 대한 지속적인 육성 및 분석을 통하여 GM 작물 실용화 연구를 계속적으로 수행하고자 한다.

나. 연구개발 목표대비 실적

연구개발성과

성과목표	사업화지표										연구기반지표							
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과		교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	진수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문	학술발표			정책활용	홍보전시	
최종목표	9	6										3						
1차년도	목표	2	0															
	실적	3	2									1			2			
2차년도	목표	3										1						
	실적	4										1			2			
3차년도	목표	2	1									1						
	실적	1	1										2				1	
4차년도	목표	2	1									1						
	실적	2										1	3					
5차년도	목표		4															
	실적	3										1	2	1				
합계	목표	9	6									3						
	실적	13	3									3	3	6	4		1	

연구개발성과의 활용계획 (기대효과)

Chromatin architecture 조절기술을 통한 다수성 형질 관련 유용 유전자의 발굴 및 기능 검정을 수행하여 이에 대한 지적소유권을 우선 확보하고, 본 유전자들에 대한 기술이전을 통하여 경제적 이익을 추구할 것이다. 이때 유전자의 기능을 강화하기 위하여 관련 전공자(식물 생리·생화학자 등)와의 공동연구를 적극 추진할 것이며, 이러한 연구 결과는 유용 유전자의 기술이전에 있어서 보다 부가가치를 높일 것이다. 한편 본 사업에 적용한 유전자는 다수성 및 생산성 증대 형질의 제공에 있어서 폭넓은 식물 스펙트럼을 가지므로 타 경제작물 개발에도 적용이 가능하리라 기대된다.

본 사업을 통해 개발된 다수성 농업 형질을 나타내는 우수계통은 이후 안정성 평가 등의 GM 실용화 연구를 통하여 다수성 GM 콩 품종 개발을 완성하고자 한다. 개발되는 다수성 GM 콩 품종은 벡터 및 유전자에 대한 지적소유권 확보로 특허에 대한 문제점을 최소화할 수 있어 작물의 실용화에 유익하게 활용할 수 있을 것이다. 또한 다수성 GM 콩 품종 개발은 다국적기업의 최근 종자개발 전략과 일치하므로 해외 진출에 있어 많은 장점을 가질 수 있을 것이다.

중심어 (5개 이내)

chromatin architecture 조절	다수성	콩	형질전환	우수계통
---------------------------	-----	---	------	------

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 국내외 기술개발 현황	26
3. 연구수행 내용 및 결과	29
4. 목표달성도 및 관련분야 기여도	150
5. 연구개발결과의 활용계획	160
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	163
7. 연구개발성과의 보안등급	167
8. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	168
9. 연구개발과제의 대표적 연구실적	171
10. 참고문헌	172

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제 1 장. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

제 1 절. 연구개발의 필요성

가. 연구개발대상 기술의 경제적 · 산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

1) 배경

21세기 인류는 의학의 발전과 생활환경의 개선 등으로 평균수명이 길어지고 인구는 급속도로 증가하여 1960년 30억이었던 세계인구가 2007년에는 두 배 이상 증가한 66억에 이르렀고 2025년에는 약 80-85억 정도로 증가할 것으로 추정되고 있다. 그러나 전 세계적으로 산업화에 따른 농지면적의 감소와 온난화와 같은 기상조건 악화 등의 요인으로 심각한 식량부족 문제가 나타나고 있다(그림 1). 최근 지구온난화에 따른 곡물 생산의 어려움이 올해 여름 미국, 러시아, 남미의 가뭄과 함께 최고조에 달해 2012년 8월 현재 국제곡물가격이 최고치를 기록하고 있고, 이러한 곡물 가격 상승 및 식량 부족 현상은 앞으로 계속 지속되리라 판단된다.

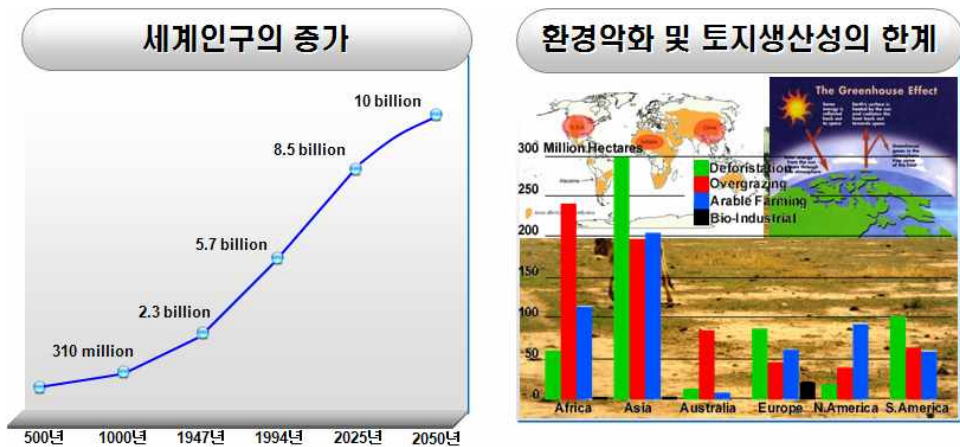


그림 1. 세계 인구의 증가 곡선(왼쪽)과 환경악화 및 토지 생산성 한계(오른쪽)

현재 세계인구의 15%에 이르는 약 8-9억 정도의 인구가 만성적인 영양실조 상태에 있는데, 이로 인한 단백질, 비타민, 무기염류 등의 결핍은 인류에게 심각한 질병을 야기하고 있다. 그리고 25년 후에 증가할 인구 15-20억 명에게 식량을 제공하기 위해서는 세계 식량생산량이 적어도 30%는 증가해야 한다. 이러한 이유로 종자 산업 선진국 및 다국적 종자 기업들은 생산성 향상과 생산비 절감이라는 목표를 달성하기 위한 방향으로 다수성 종자 개발에 집중하고 있다.

품종보호제도(UPOV) 전면시행(2012년)으로 유전자원 확보와 종자산업의 무한 경쟁: 우리나라의 UPOV 가입(2002년)과 품종보호제도 전면시행으로 로열티 지급의무 발생 품목이 급증하고 있으나 여전히 이에 대응하는 유전자원의 확보와 새로운 품종 개발은 미흡한 실정이다. 미국의 경우, 지난 100여 년간 한반도 등에서 수집한 4,000종 이상의 콩 종자를 수집해 품종 개량하여

현재 콩 수출 세계 1위 국가로 도약했다는 사실은 시사하는 바가 크다(출처: 미래농업의 견인차, 종자산업, SERI, 2009). 최근 FTA 타결 확대, DDA 진전 등에 따라 유전자원을 수집하기 위한 국가 간 경쟁이 치열해 지고 있으며, 각국은 우수하고 고유한 유전자원을 경쟁의 주요 수단으로 활용하고 종자주권을 강화하고 있다. 따라서 주요 작물에 대한 신품종 개발은 국가농업 안보 차원에서 필수적이라 할 수 있다.

전 세계 주요 식량자원으로서의 콩 시장 규모 및 현황: 콩은 전 세계의 대표적인 식량 작물로서 전 세계 수출입 교역시장 규모는 2008년 기준 약 35,132,368천불(수출 규모)/43,754,644천불(수입 규모)로 매우 큰 시장 규모를 가지고 있다(FAOSTAT, 2011 기준). 이러한 시장 규모는 전 세계 주요 작물중 하나인 옥수수 시장 규모보다 오히려 큰 것으로 알려지고 있다. 그러나 한국 시장 규모는 2008년 기준 약 65천불(수출 규모)/ 791,869천불(수입규모)로 열악한 상황이며, 수출에 비하여 10배 이상의 수입 규모를 가져 심각한 수출입 불균형으로 절대적으로 수입에 의존하는 실정이다(Table 1). 콩의 높은 영양, 다양한 산업소재로의 활용 및 사료작물로서의 가치 등 국민 생활에 미치는 중요성을 고려할 때, 현재 국내 콩 자급률은 31.7%로 현저하게 낮으며, 생산기반마저 한반도의 기후변화에 따라 예상되는 가뭄이나 홍수등과 같은 재해에 매우 취약하여 이에 대비한 신품종개발이 이루어 지지 않을 경우, 심각한 수확 감소피해가 예상되어 콩의 생산 부족에 대한 국내에서 안정적 생산 기반 확보가 절실히 필요한 상황이다.

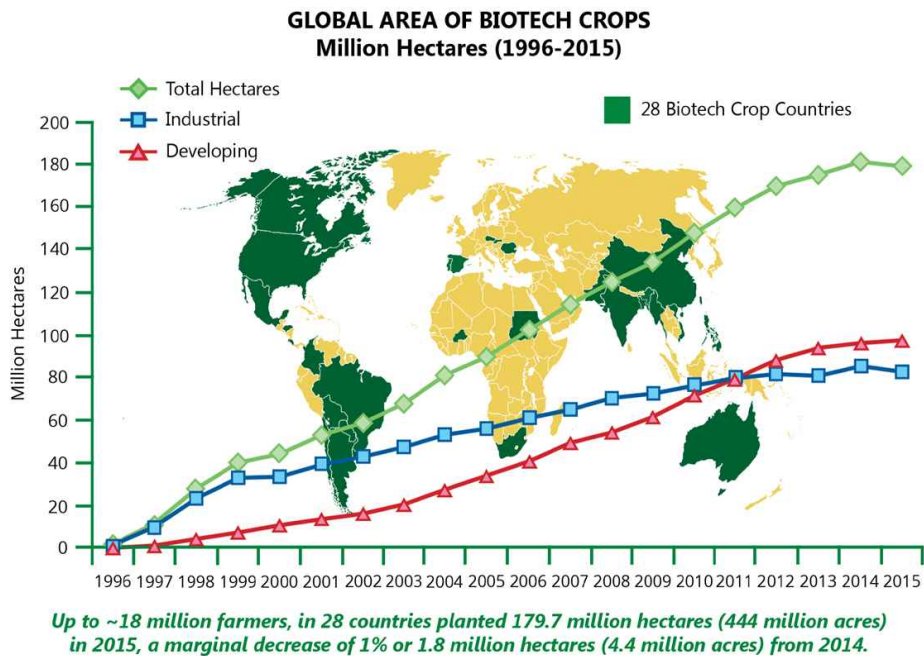
Table 1. 전 세계 콩 시장 규모와 재배 면적 및 한국의 시장 규모와 재배 면적 (FAO 통계, 2011, faostat.fao.org)

Year		2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
World	Export value (1000\$)	10772162	15577785	15583852	15789456	16134418	22934556	35132368	33105318
	Import value (1000\$)	12295313	17212345	19584314	18967770	17851012	26390203	43754644	35993409
	Area Harvested (Ha)	83637497	91593387	92519724	95276367	90131752	96441295	99372337	102386023
Korea	Export value (1000\$)	51	111	138	89	54	33	65	116
	Import value (1000\$)	317995	399203	480300	391449	321381	414664	791869	592158
	Area Harvested (Ha)	80447	85270	105421	90248	76267	75242	70265	71422

GM작물 개발을 통한 종자산업의 메가트렌드 변화: 고전 육종을 통한 작물의 수확성 증가 속도는 1980년대를 정점으로 많은 노동력과 긴 연구기간, 교배 모본으로 사용되는 유전자원의 고갈 등으로 인해 크게 둔화되어 현재의 재배와 육종을 통한 생산량 증가에 의한 식량의 확보는 한계에 이르고 있다.

21세기 식물생명공학 산업은 다양한 식물로부터 유용 유전자를 발굴하고 그 유전자를 경제작물에 도입하여 개량 형질의 우수 품종을 개발하는 것이 새로운 전략으로 대두되고 있다. 최근 기능성 유전체 연구를 통하여 유용 유전자의 대량 발굴이 세계적으로 확산되고 있으며, 이러한 유용 유전자의 경제작물로의 도입은 특수 목적 혹은 기능성 맞춤, 특히 다수성 작물의 개발을 통한 고부가 가치 창출이 가능하게 할 것이다.

2010년 기준 세계 종자 시장의 40%이상(160억 달러)을 GM 종자 시장이 점유하고 있으며, 2007년 세계시장에서 차지하는 GM 종자의 비중은 약 20%에 불과하였으나, 2015년 이후에는 50% 이상을 차지할 것으로 전망되고 있으며, 또한 GM 작물 재배규모가 1996년 이후 지속적인 성장세를 나타내고 있고 최근의 바이오에너지 작물 개발이 급속도로 진행되면서 그 시장 규모는 기하급수적으로 증가할 것으로 추정된다(그림 2).



Source: Clive James, 2015.

그림 2. Global Area of Biotech Crops (Clive James, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2015, ISAAA)

콩의 경우도 마찬가지로 전 세계적으로 GM 콩 재배 면적이 기하급수적으로 증가하고 있다. 1997년 GM 콩의 점유율은 전체 콩 재배면적의 7.6%를 나타내었으나 2008년에는 GM 콩의 점유율이 72%를 차지하였다. 미국에서도 마찬가지로 1997년 GM 콩의 점유율은 전체 콩 재배면적의 4%에 불과하였으나 2008년에는 GM 콩의 점유율이 92%를 차지하였다(그림 3). 따라서 시장규모의 기하급수적 성장 양상을 보이고 있는 콩은 식량 및 사료 작물의 수입 대체, 수출입 안정화를 통한 시장 안정화 및 재배농가 소득증대 효과까지 제공한다는 점에서 GM 작물의 개발이 상대적으로 많은 장점을 제공하리라 확신하며, 이러한 상황을 종합해 볼 때 GM 콩 개발은 선택이 아닌 필수 사항인 것으로 판단된다.

연구개발대상 기술의 기반성: 이러한 GM 작물 개발 및 산업화의 기술적 요소는 유전자 발굴, 유전자 기능분석, 작물 형질전환, 이벤트 육성 등의 기술이다. 최근 유용 표현형질을 지닌 유전자의 발굴 기법으로, 다량의 변이체를 생산하여 일차적으로 표현형 검정을 거쳐 이후 이들의 표현형 변화를 유발하는 원인이 되는 유전자를 다량으로 동정하는 기능성 유전체 연구가 유전자 발굴 및 기능분석 요소에 대한 핵심 기술로 적용되고 있다. 본 연구팀 중 주관 기관인 제노

마인(주)는 최근 기능성 유전체 연구를 통하여 chromatin architecture의 조절 기술로 식물의 다수성 표현 형질을 제공하는 유용 유전자를 다량 확보하고 있다. 그 중 본 기술과 관련된 유전자에 대한 예를 들어보면 AT-hook protein으로 알려지고 식물의 chromatin architecture를 조절함으로써 기능을 가지는 ATPGs(AT-hook proteins of Genomine)를 encoding하는 유전자들은 작물의 다수성 및 바이오매스 증대 등과 같은 표현형적 특징을 제공할 뿐만 아니라 건조 등과 같은 기후변화 대응 조절도 제공한다고 증명하였다. 따라서 이와 같은 유용 유전자의 주요 식량 자원인 콩에 대한 적용은 다수성 및 종자 생산 안정성 품종 개발에 있어서 많은 장점을 제공하리라 확신한다.

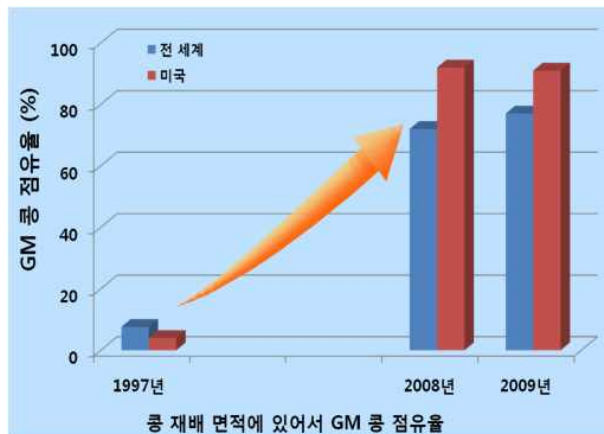


그림 3. 미국 및 전 세계 콩 재배면적에 있어서 GM 콩의 재배 점유율 (Global status of Biotech/GM crops, ISAAA, 2011)

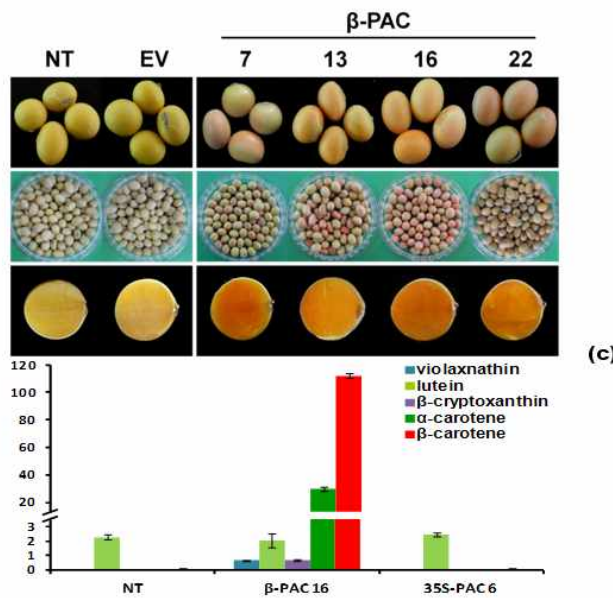


그림 4. PAC 유전자 도입을 통한 β -carotene 다량 축적 신기능성 우량 콩 형질전환체 개발

GM 작물 개발 및 산업화의 두 번째 요소는 작물 형질전환 및 이벤트 육성 기술이다. 협동기관인 동아대학교 정영수 교수 연구팀은 국내 콩 품종의 고효율 형질전환 시스템을 확립하였으며, 이를 통하여 신 기능성 및 다수성 형질 발현 콩 형질전환체 개발을 성공하였으며(그림 4 참조), 현재 경북대학교 이정동 교수 연구팀과 공동으로 이들에 대한 포장에서의 목표 형질 및 농업 형질 검정을 수행하고 있다. 이러한 콩에 대한 고효율 형질전환 시스템 확립 및 이벤트 육성 기술은 우량 콩 품종 개발에 공헌할 수 있는 핵심 기술이다. 따라서 다수성 콩 신품종 개발에 대한 주관기관과 협동기관의 기술력은 본 사업의 성공에 대한 초석이 될 것이다.

2) 연구개발대상 기술의 핵심성

급속한 인구 증가 및 기후 변화로 인한 식량 생산량 부족과 국내에서의 낮은 식량 자급률은 생산성 향상과 생산비 절감이라는 목표를 달성하기 위한 방향으로 다수성 종자 개발에 집중하게 하고, 이러한 품종 개발은 국가 농업 경쟁력 확보 및 FTA 대응, 그리고 global 시장 개척에 있어서 선택이 아닌 필수 요소인 것으로 판단된다.

전 세계 주요 작물 중 하나인 콩은 식량 및 사료 자원으로서 뿐만 아니라 건강보조제, 바이오디젤, 잉크 등 산업용 소재 등으로 외연 확대가 활성화되면서 시장 규모가 기하급수적으로 성장세를 유지하고 있으며(그림 5), 이러한 사실은 작물의 활용 영역의 확대를 통한 고부가 가치 창출을 이루는데 많은 장점을 제공할 것이다.



그림 5. 콩 종자산업의 외연 확대 사례 (신중수, 2012, 글로벌 종자산업, 세계농업 제139호)

다수성 우량 콩 품종을 개발하기 위해서는 종자 수확량 증가와 같은 표현형을 제공하는 유전자의 확보 및 발굴과, 우량 콩 품종에 있어 핵심 기술인 고효율 콩 형질전환 시스템 확립 및 이벤트 육성 기술이 관건이다. 흥미로운 사실은 식물의 노화 조절은 1차적으로 작물의 생산성 증가에 결정적 공헌을 할 수 있다는 것이다. 기존 보고에 의하면(Gan *et al*, 1995), 담배에서 노화 조절을 통해 생산성을 최고 50%까지 증가시킬 수 있었으며, 또한 벼(personal communication, 국제미작연구소, 2004)와 콩(Guiamett *et al*, 1990)과 같은 곡물류에서도 노화 조절을 통해 생산성이 각각 최소 10%, 30% 이상의 증대 효과를 얻을 수 있었다. 그러나 이러한 노화 조절 유전자의 적용에 있어서 많은 경우는 작물의 수확 시기에 대한 문제점을 제공하

여 상업화에 있어서 단점이 된다는 것이다. 따라서 작물의 수확 시기가 야생형과 비슷한 다수성 작물의 개발이 필요한데, 본 연구팀이 확보하고 있는 chromatin architecture 조절 기술은 다수성 작물 개발이 가능하게 하고, 또한 흥미로운 점은 수확 시기에 있어서 야생형과 비슷하다는 것이다. 그러므로 본 연구팀이 확보하고 있는 chromatin architecture 조절 기술은 야생형과 비슷한 수확 시기를 가지고 다수성을 제공한다는 점에서 다수성 우량 콩 품종 개발에 많은 장점을 제공하며, 또한 본 기술은 건조 등과 같은 기후 변화 대응에 대한 조절도 가능하게 함으로써 최종적으로 다수성 뿐 만 아니라 종자 생산 안정성도 가지는 우량 품종 개발이 가능하게 할 것이다.

따라서 본 과제는 chromatin architecture 조절 기술을 개발하고, 전 세계 주요 작물 중 하나인 콩에서의 활용성을 연구하여 최적의 다수성 농업 형질을 가지는 신기능성 콩 품종 개발을 목적으로 한다.

Chromatin architecture 조절기술: 이러한 다수성 콩 품종 개발에 있어서 개체 크기, 종자 수확량 증가 등과 같은 목표형질을 제공하는 chromatin architecture 조절기술은 또한 기후 변화 대응 조절도 가능하여 다수성 및 종자생산 안정성 콩 품종 개발에 있어 범용적 응용이 가능한 핵심 기술이다. 본 연구팀은 다수성 콩 품종 개발의 연구 추진 속도를 가속화하기 위하여 일차적으로 기 확보된 유용 유전자를 콩 품종 개발에 적용하고자 하며, 보다 다양하고 강력한 표현형질을 가진 품종을 개발하기 위하여 chromatin architecture 조절기술을 보다 발달시켜, 그 기능을 검정하고 신품종 개발에 적용하고자 한다.

본 연구팀은 현재 chromatin architecture 조절기술을 콩에 적용하여 형질전환, 형질전환체 생산 그리고 다수성 농업형질을 가지는 형질전환체를 개발하고 있다. 특히 ORE7 유전자를 이용한 다수성 콩 형질전환체의 개발은 본 사업의 성공에 대한 확신을 제공할 것이며, 확보하고 있는 chromatin architecture 조절 관련 유용 유전자는 사업의 조기 성공을 이끌어내어 상업화에 대한 초석을 제공할 것으로 판단된다.

콩 형질전환 및 이벤트 육성 기술: 콩의 품종 개발은 전통적인 육종 방법을 이용하고 있으나, 최근 분자생물학적 방법을 이용하여 신품종 개발이 시도되고 있다. 그러나 아직 국내에서 콩에 대한 상업적으로 안정적인 형질전환 성공 사례는 거의 없는 실정이다. 본 연구팀은 국내 콩 품종인 광안콩을 이용하여 아그로박테리움을 매개로 한 고효율의 안정적인 형질전환 기법을 확립하였으며, 이를 통한 형질전환체 생산, 그리고 신기능성 및 다수성 형질 발현 형질전환체 개발을 수행하고 있으며, 개발된 형질전환체는 포장시험을 통하여 농업 형질 검정을 수행하고 있다. 이러한 아그로박테리움 매개 고효율 콩 형질전환 기법 및 이벤트 육성 기술은 본 과제의 핵심기술이다.

나. 본 과제의 기술과 관련된 본 연구팀의 선행연구 결과

1) 다수성 콩 품종 개발용 chromatin architecture 조절기술 개발(주관 기관)

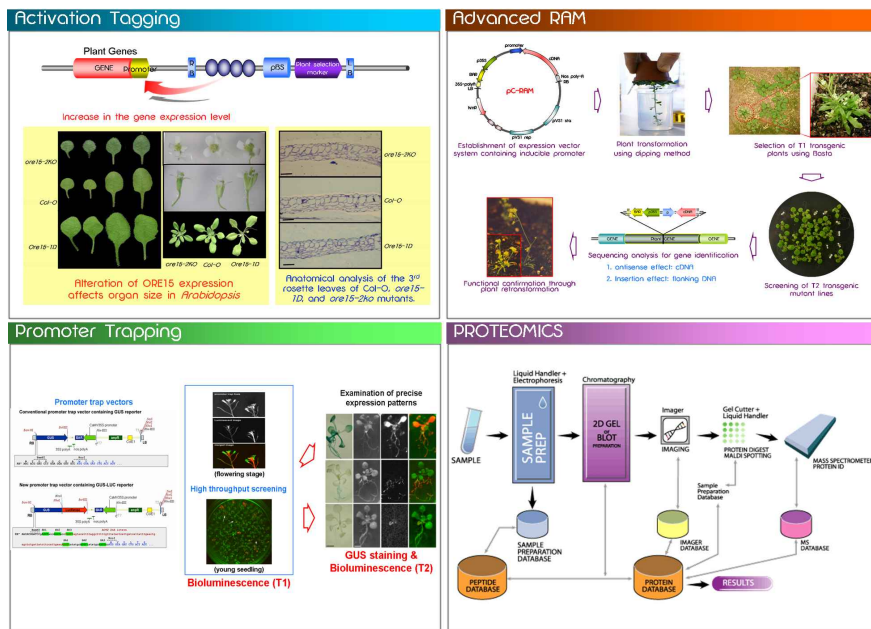


그림 6. 제노마인(주)에서 확보하고 있는 기능성 유전체 연구 기법

주관 기관인 제노마인(주)는 식물의 기능성 유전체 연구를 통하여 농업에 직접 이용 가능한 식물 유용 기능성 유전자의 대량발굴을 수행하고 있으며, 여기에 gene expression profiling 기법인 plant proteomics를 접목하여 생체 내 gene networking 등 유전자의 기능을 효율적으로 밝히고 있는 중이다(그림 6).

최근 본 연구팀은 식물의 organ size, 종자 수확량 증가와 같은 표현 형질을 유도하는 chromatin architecture 조절 관련 유전자들을 대량 발굴하고 이들의 기능 분석에 집중하여 종자 수확량 증가 유도 chromatin architecture 조절 기술을 개발하였다.

Chromatin architecture 조절은 DNA methylation, histone acetylation/deacetylation 등을 조절하는 유전자 및 chromatin binding을 통하여 기능을 가지는 유전자 등에 의해 유도되며, 이러한 chromatin architecture 조절은 식물 발달의 다양한 현상을 조절하고, 또한 epigenetic effect를 가져 보다 폭 넓은 작용 스펙트럼을 제공하는 것으로 알려지고 있다(Li et al., 2002).

본 연구팀의 AT-hook protein을 encoding하는 유전자를 이용한 chromatin architecture 조절기술은 식물의 노화 진행 동안 chromatin의 안정성을 제공하여 식물의 종자 수확량 증대 또는 노화 지연의 표현형적 특징을 나타내었다. 흥미로운 점은 이러한 표현형적 특징은 적용 유전자의 발현 레벨에 따른다는 것이다. 적용 유전자의 발현이 강하면 강할수록 노화 지연의 표현형이 강력하게 나타나고, 적용 유전자의 발현이 적정 수준을 유지하면 식물의 바이오매스 증대 및 종자 수확량 증가에 대한 특징적인 표현형을 가졌으며, 특히 종자 수확량 증가에 대한 표현형적 특징은 야생형과 비슷한 수확시기를 가진다는 점에서 본 기술이 종자 수확량 증가에

대한 형질 제공에 있어 아주 강력할 것으로 판단된다(그림 7). 또한 본 기술은 건조 등과 같은 기후변화 대응에 있어서도 저항성을 제공하여 종자 수확량 증가뿐 만 아니라 종자생산 안정성 형질 제공에 있어서도 보다 많은 장점을 제공할 것으로 확신한다. 본 연구팀은 chromatin architecture 조절에 관여하는 유전자를 현재 6종 이상 발굴하였으며, 기능성 유전체 연구 혹은 homology approach 등을 통하여 종자 수확량 증가와 종자 생산 안정성에 강력한 형질을 제공하는 chromatin architecture 조절 유전자를 추가적으로 발굴하고 있는 중이다.

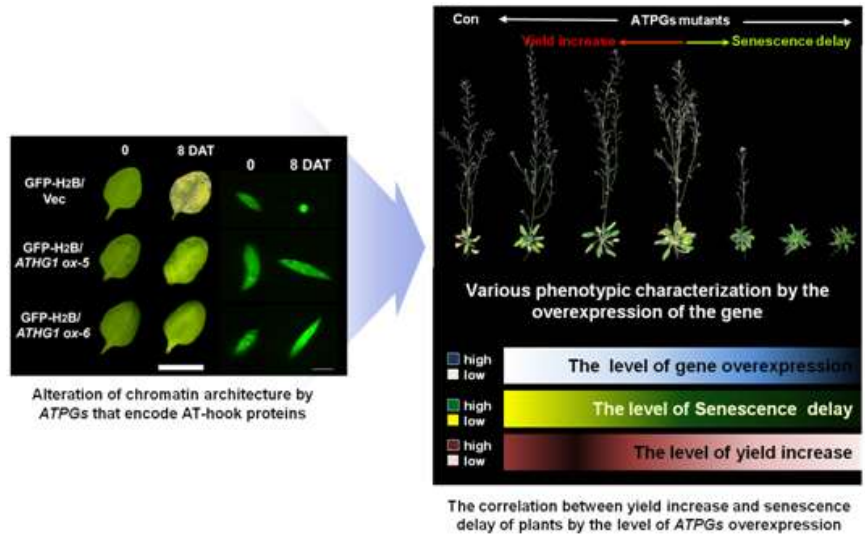


그림 7. Chromatin engineering technology of Genomine shows a wide range of yield increase and/or senescence delay in the plants by the expression level of ATPGs genes

우리는 본 기술이 우량 작물 개발에 적용이 가능한지를 확인하기 위하여 콩과 유채, 그리고 잔디에 본 기술 관련 유전자인 ORE7을 적용하여 생산된 형질전환체의 표현형적 특징을 조사하였다. 그 결과 콩, 유채 그리고 잔디 모두에서 기대했던 표현형적 특징, 즉 종자 수확량 증가, tiller 수의 증가 등과 같은 생산성 증대의 표현형적 특징을 확인할 수 있었다. 콩에서 ORE7 유전자의 도입은 콩의 녹기 연장과 종자 수확량 증가와 같은 뚜렷한 표현형적 특징을 나타내었고, 이러한 표현형적 특징은 유전자 발현 레벨의 차이에 의해 이루어지는 것으로 확인되었다. 즉, 유전자의 발현이 강하면 강할수록 녹기연장의 표현형을, 그런 반면 유전자의 발현이 약한 상태에서 적정 수준에 도달하면 종자 수확량 증가와 같은 다수성 농업형질의 표현형을 나타내었다(그림 8). 또한 잔디에서도 같은 경향을 나타내는데, 잔디에서 ORE7 유전자의 도입은 잔디의 녹기연장, 그리고 tiller 수의 증가와 같은 생산성 증대의 형질을 나타내었고, 이러한 표현형적 특징은 유전자의 발현 레벨의 차이에 의해 이루어지는 것으로 확인하였다(그림 9 왼쪽). 흥미롭게도, chromatin architecture 조절 기술은 염 혹은 건조와 같은 기후 변화에 대한 적응성도 제공하였다(그림 9 오른쪽 참조). 따라서 본 기술은 쌍자엽 작물뿐만 아니라 단자엽 작물에서도 적용이 가능하고, 기후변화 대응 조절이 가능하다는 점에서 본 기술이 다양한 작물에서 다수성 형질을 나타내는데 있어 많은 장점을 제공할 것으로 판단된다.

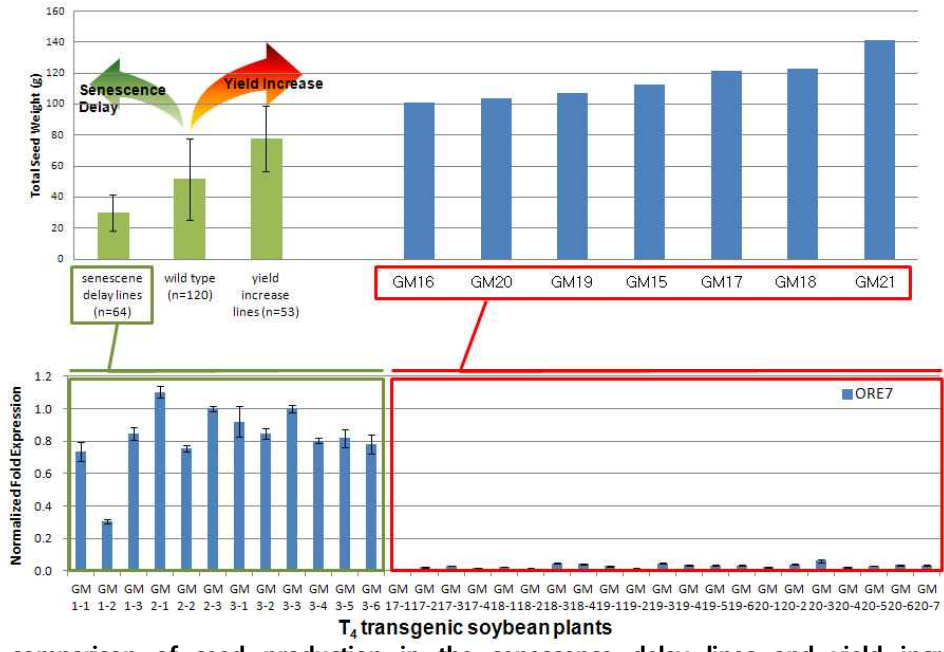


그림 8. The comparison of seed production in the senescence delay lines and yield increase lines of T₃ ORE7-introduced soybeans (upper) and gene expression of ORE7 in the T₄ transgenic soybean plants using qRT-PCR (lower). GM16, GM20, GM19, GM15, GM17, GM18 and GM21: representative yield increase lines.



그림 9. 우량 잔디 형질전환체의 생산성 증대 표현형 및 유전자 발현(왼쪽), 그리고 염 스트레스 저항성 표현형(오른쪽)

본 사업에 적용할 chromatin architecture 조절 기능을 가지는 확보 유전자는 다음과 같다.

(1) *ATPG3* (AT-hook protein of Genomine 3): AT-hook DNA-binding protein을 encoding 하는 유전자 그룹에 포함되는 유전자로 그들이 발현 조절을 통하여 식물의 노화 지연 혹은 식물의 종자 수확량 증가에 대한 표현형적 특징을 가지며, 또한 기후 변화에 대한 적응성을 제공하는데, 특히 건조 스트레스에 대해 강력한 형질을 제공한다(그림 10).

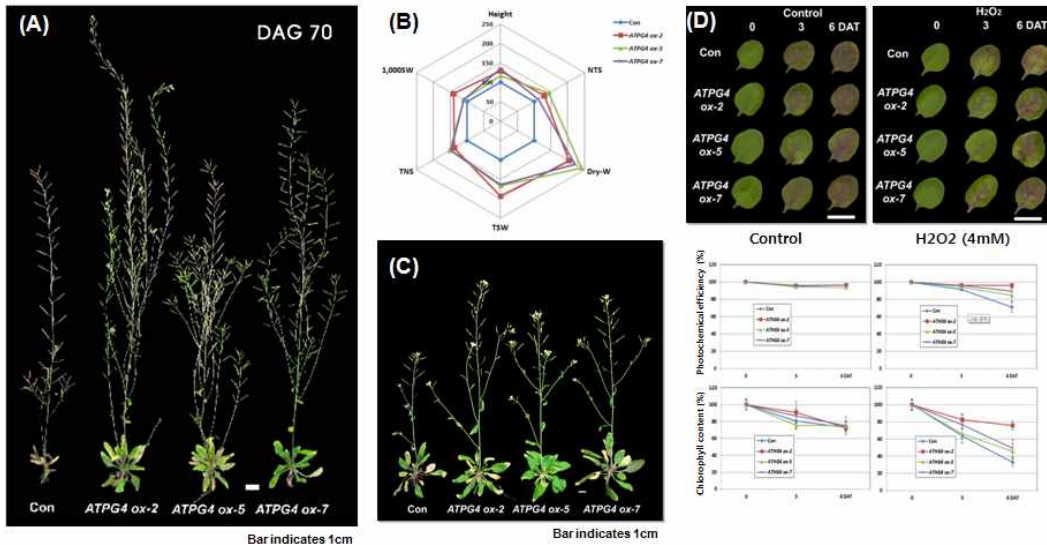


그림 10. *ATPG4* 과발현된 애기장대의 표현형적 특징(A), 생산성 증대 지표를 통한 바이오매스 증대 및 종자수확량 분석(B), 건조 스트레스에 대한 저항성(C), 그리고 산화 스트레스에 대한 저항성(D)

(2) *ATPG4* (AT-hook protein of Genomine 4): AT-hook DNA-binding protein을 encoding 하는 유전자그룹에 포함되는 유전자로 식물의 바이오매스 증대 및 종자 수확량 증가에 특히 강력한 표현형을 가지고 *ATPG3*과 마찬가지로 수명 연장에 대한 표현형적 특징을 제공하며, 식물체의 표현형적 분리는 본 유전자 발현 레벨 조절을 통해 이루어지는 것으로 나타났다. 또한 기후 변화에 대한 적응성을 제공하는데, 특히 건조 및 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공하는 것으로 나타났다(그림 11).

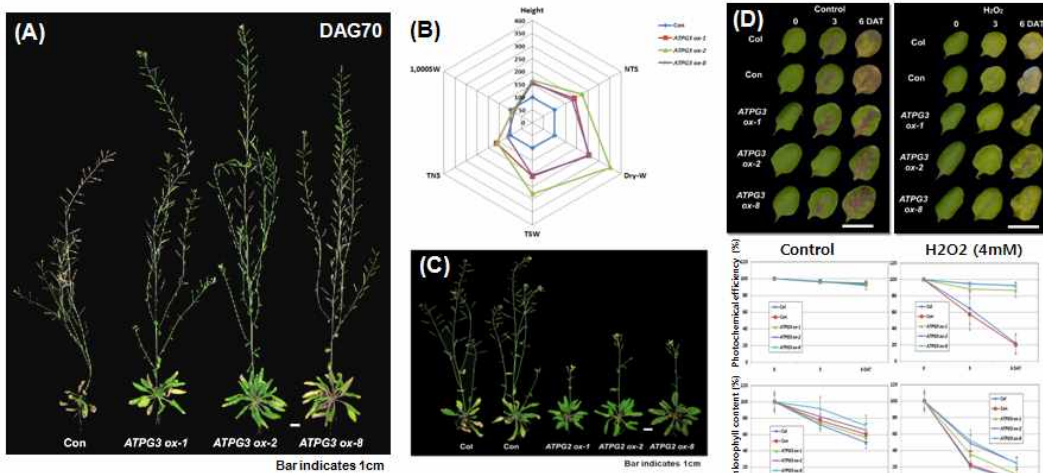


그림 11. *ATPG3* 과발현된 애기장대의 표현형적 특징(A), 생산성 증대 지표를 통한 바이오매스 증대 및 종자수확량 분석(B), 건조 스트레스에 대한 저항성(C), 그리고 산화 스트레스에 대한 저항성(D)

(3) *ATPG7* (AT-hook protein of Genomine 7): AT-hook DNA-binding protein을 encoding 하는 유전자 그룹에 포함되는 유전자로 앞선 두 유전자에 비하여 기후 변화에 대한 강한 적응성을 제공한다. *ATPG7* 유전자도 앞선 유전자와 마찬가지로 수명 연장에 대한 표현형적 특징,

그리고 유전자의 발현 조절을 통하여 종자 수확량 증가의 표현형적 특징을 가진다(그림 12).

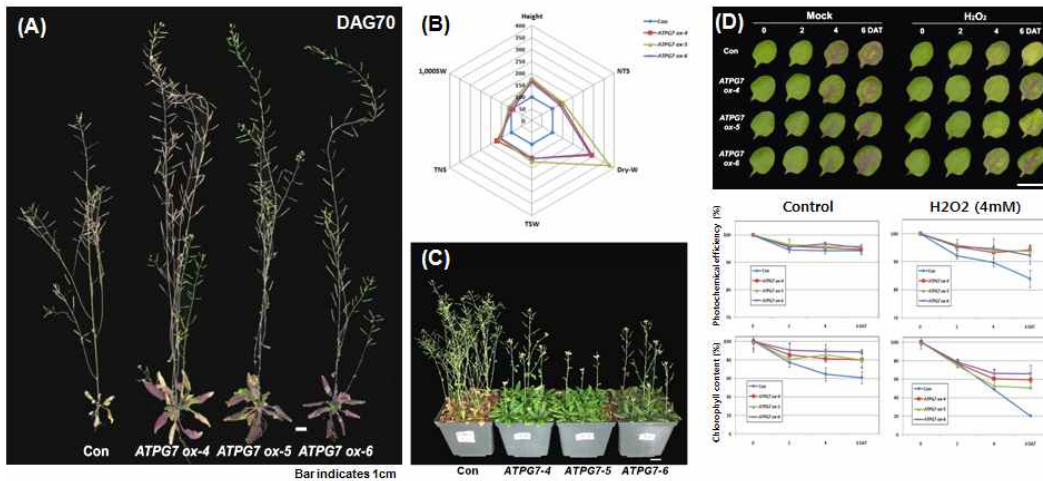


그림 12. *ATPG7*이 과발현된 애기장대의 표현형적 특징(A), 생산성 증대 지표를 통한 바이오매스 증대 및 종자 수확량 분석(B), 건조 스트레스에 대한 저항성(C), 그리고 산화 스트레스에 대한 저항성(D)

(4) *ATPG8* (AT-hook protein of Genomine 8): AT-hook DNA-binding protein을 encoding 하는 유전자 그룹에 포함되는 유전자로 *ATPG7* 유전자와 마찬가지로 기후 변화에 대한 강한 적응성을 제공한다. 또한 *ATPG8* 유전자도 앞선 유전자와 마찬가지로 수명 연장에 대한 표현형적 특징, 그리고 유전자의 발현 조절을 통하여 종자 수확량 증가의 표현형적 특징을 가진다(그림 13).

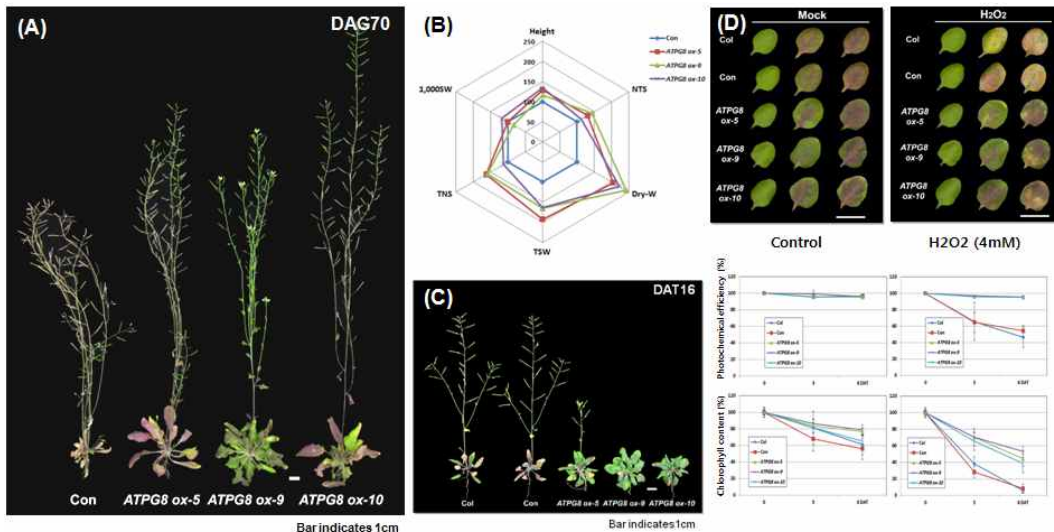


그림 13. *ATPG8*이 과발현된 애기장대의 표현형적 특징(A), 생산성 증대 지표를 통한 바이오매스 증대 및 종자 수확량 분석(B), 건조 스트레스에 대한 저항성(C), 그리고 산화 스트레스에 대한 저항성(D)

2) GM 콩 실용화 연구를 위한 콩 형질전환용 벡터 개발 기술 개발 (주관기관)

GM 콩 실용화 연구를 위하여 제노마인(주)은 SEN1 promoter를 이용한 pCSEN 벡터를 개

발하였다. pCSEN 벡터의 SEN1 promoter는 포항공대 남홍길 박사가 발굴한 promoter로 특허 출원 없이 국제 학술지에 논문으로 게재한 상태로 특허의 청구 범위에 있어서 자유롭고, 식물의 발달 단계 중 노화관련 및 부분적으로 스트레스 관련 promoter이기 때문에 식물의 발달 초기에는 정상적 생육을 유지할 수 있는 장점이 있고, 본 연구팀에서 발굴하는 유전자 그룹은 최고 발현 조건이 아닌 낮은 발현 조건에서 최적의 기능을 가지기에 본 벡터의 사용은 다수성 우량 콩 품종 개발에 보다 많은 장점을 제공하리라 판단된다(그림 14).

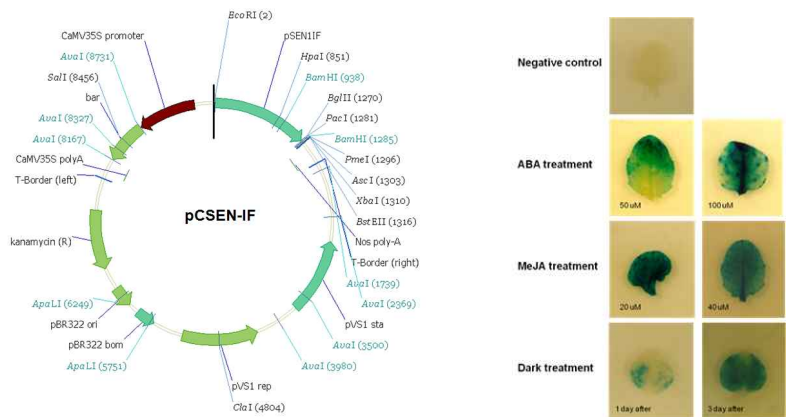


그림 14. pCSEN-IF vector map for soybean transformation and the vector activity against various stress conditions

3) 콩 형질전환 기술 개발 (협동기관) 및 형질전환체 개발 (주관/협동 공동연구)

본 과제의 협동 기관인 동아대 정영수 박사 연구팀은 국내 콩 품종의 형질전환 체계를 이미 확립하여 콩 형질전환체 개발을 수행하고 있으며(그림 15), 최근 *AtSZF2* 도입을 통해 염 저항성을 가지는 콩 형질전환체 개발에 성공하여 국내 특허 출원을 하였다(대한민국 특허출원 10-2011-0007862, 10-2011-0084975). 또한 ORE7 도입 다수성 형질전환체 개발에도 성공하여 현재 포장시험을 통하여 농업 형질 특성을 분석하고 있는 중이다.

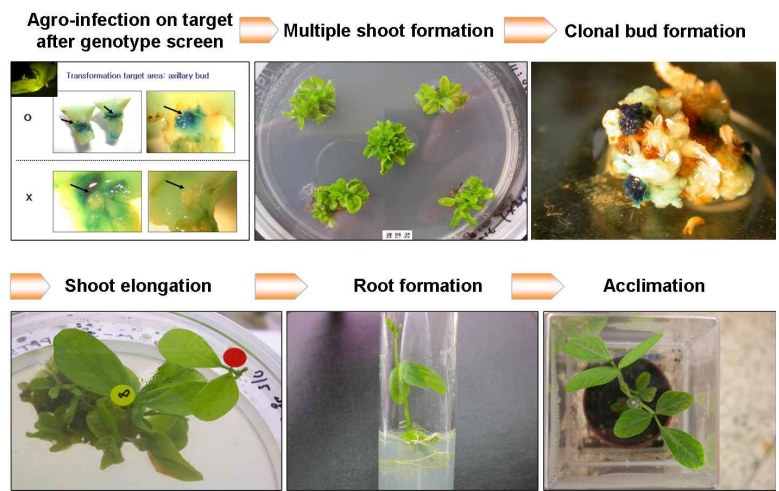


그림 15. 아그로박테리움 매개 콩 형질전환 과정

AtSZF2 콩 형질전환체 개발: *AtSZF2(AtSIZ)* 콩 형질전환체의 *in vivo* 염분 스트레스에 대한 저항성을 확인하기 위하여 락울을 이용하여 T2 형질전환 식물체를 200 mM의 NaCl 스트레스 하에서 10일간 방치하였다. 그 결과, *in vitro*의 결과와 마찬가지로 #4와 #6 형질전환 라인에서 염분 스트레스에 대한 저항성을 강하게 나타나는 것을 확인 할 수 있었고, 염분에 의한 세포 사멸 정도를 알아보기 위해서 ion leakage를 측정해 본 결과, 대조구보다 #4와 #6 형질전환 라인에서 세포사멸 정도가 낮은 것을 알 수 있었다(그림 16). 그리고 우리는 *AtSZF2*의 발현을 통하여 염분 스트레스 저항성을 가지는 변이체의 염분 스트레스 관련 유전자 발현을 조사해 본 결과, 콩의 염분 스트레스 관련 유전자 중 대부분의 유전자(*GmDREB2*, *GmDREB3*, *GmOLPb*, *GmERF3*, *GmPHD2*, *GmGT-2A*, *GmGT-2B*, *GmbZIP62*, *GmWRKY54*) 발현이 증가하였음을 알 수 있었다(그림 17). 따라서 *AtSZF2*의 삽입을 통한 콩에서의 발현은 콩의 염분 스트레스 관련 유전자의 발현을 증가시킴으로써 염분 스트레스에 대한 저항성을 제공할 것으로 추측된다.

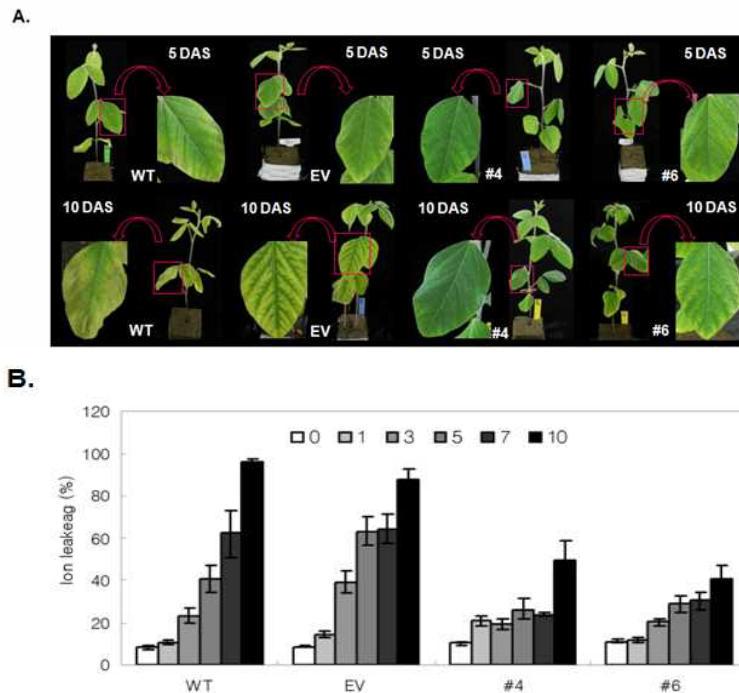


그림 16. *AtSZF2* 발현 형질전환체의 200 mM NaCl 처리에 의한 표현형적 특징(A), ion leakage 분석(B)

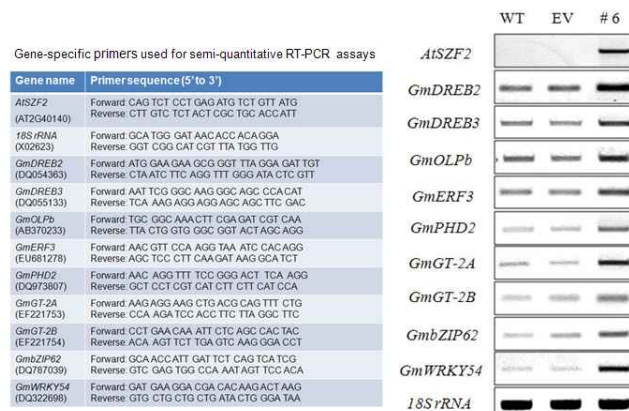


그림 17. *AtSZF2* 발현 형질전환체의 염분 스트레스와 관련된 콩 유전자의 발현 양상

확보 유전자에 대한 콩 형질전환 및 형질전환체 생산: 협동기관인 동아대는 현재 본 사업에 적용하고자 하는 확보 유전자 *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, 그리고 *ATPG8*에 대하여 형질전환 및 형질전환체 생산을 수행하고 있다(그림 18 참조). 이러한 선행 연구는 본 사업의 확신 및 조기 성공에 대한 초석이 될 것으로 판단된다.

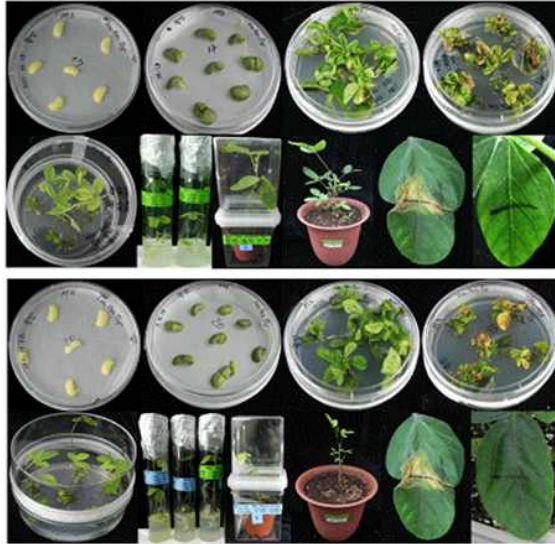


그림 18. *ATPG3*(위쪽)과 *ATPG4*(아래쪽) 도입 콩 형질전환체의 재분화 및 생산 과정

제 2 절. 연구개발의 목표 및 내용

가. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

연구개발의 최종 목적은 전 세계 주요작물 중 하나인 콩에 chromatin architecture 조절을 통한 다수성 목표 형질이 발현되는 유용 유전자를 도입하여 다수성에 대한 우량 형질을 가지는 콩 형질전환체를 개발하여 다수성 농업 형질에 대한 우량 콩 품종 생산 기반을 마련하는 것이다.

이를 위하여 본 과제에서는 다음의 연구개발 목표를 달성하고자 한다.

- 1) 모델식물인 *Arabidopsis*에서 유용성이 검증된 chromatin architecture 조절 유전자(AT-hook domain을 가지는 유전자로 노화시기에 chromatin의 안정성을 제공하여 다수성 목표형질을 가짐) 4종을 기 확립된 형질전환 기술을 이용하여 콩에 도입하고,
- 2) 또한 chromatin architecture 조절을 통한 다수성 목표형질을 지닌 유용 유전자 6종을 새로이 발굴·분리하여 콩에 도입하고자 한다(총 10종의 형질전환체 생산).
- 3) 생산된 콩 형질전환체 7종 이상을 대상으로 다수성 목표형질에 대한 기능분석을 실시하여 2종의 다수성 목표형질을 지닌 우량 콩 형질전환체를 개발하고,
- 4) 개발된 우량 형질전환체를 포장시험을 통하여 다수성 농업 형질($\geq 120\%$ 종자수확량)을 지닌 우량 콩 품종 개발에 적용하고자 한다(2종).
- 5) 개발된 우량 형질전환체에 대한 품종 개발은 추후 GM 작물 실용화 연구를 통하여 추진하며 본 사업동안의 추진 단계는 형질전환체 개발까지를 수행한다.

연구 개발 최종 목표	연구 개발 내용
Chromatin architecture 조절을 통한 다수성 형질관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (10종)	<ul style="list-style-type: none"> · 기 확보된 유용 유전자의 기능 재검정 (<i>ATPG3</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG8</i>, 4종) · Chromatin architecture 조절을 통한 다수성 형질관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (6종) <ul style="list-style-type: none"> - 변이체 표현형 분석 및 분자·생리·생화학적 기능 조사 - 유용 유전자에 대한 loss-of-function, gain-of function 에 기장대 변이체 표현형 및 기능 분석 - 생산성 증대 지표 분석을 통한 다수성 형질 확인
유용 유전자가 도입된 콩 형질전환체 생산 (10건)	<ul style="list-style-type: none"> · 유용 유전자의 콩 도입 및 형질전환체 생산 (10건) <ul style="list-style-type: none"> - 유용 유전자의 콩 도입을 위한 특허회피 vector construct 제작 - 고효율 형질전환 시스템을 통한 콩 형질전환 실시 - 형질전환 콩의 1차 기능 분석: 유전자 도입(단일 유전자 도입 확인) 및 발현 분석 - 콩 형질전환체 생산

<p>콩 형질전환체의 기능분석(7종 이상)을 통한 우량 형질전환체 개발 (2종)</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 기능 분석을 통하여 다수성 목표형질을 지닌 우량 형질전환체 개발 (2종) - 형질전환 콩의 1차 표현형 분석(최종 7건 이상) - 형질전환 콩의 온실 및 포장 검정을 통한 농업 형질 규명
<p>우량 형질전환체의 세대 전개 및 후대 검정 (농업형질: $\geq 120\%$ 종자수확량, 2종)</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 종자 확보 및 후대 검정 (2종) - 선발된 콩 형질전환체의 밀양, 군위 등에서 GMO 포장시험을 통한 농업형질 규명 - 도입 유전자의 발현량 및 수확량 정밀 분석
<p>우량 형질전환체의 GM 작물 실용화 탐색</p>	<ul style="list-style-type: none"> · GM 작물 실용화 탐색: <ul style="list-style-type: none"> - 특허 회피 벡터 제작, 벡터 시스템 점검, 도입 유전자의 안정성 점검 등 - 형질전환체 실용화를 위한 국내 종자회사와의 협의 및 마케팅
<p>특허 및 논문 등 지적 소유권 확보 (18건)</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 특허출원/등록 15건 · 논문: 3건 (SCI 학술지 3건)

나. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

상기의 최종 연구개발 목표를 달성하기 위하여 주관기관인 제노마인(주)는 유용 유전자 발굴 및 기능 검정, 협동기관인 동아대는 콩 형질전환 및 형질전환체 생산, 그리고 협동기관으로부터 생산된 형질전환체의 다수성 목표 및 농업형질 관련 기능 분석, 우량 형질전환체 개발 및 GM 작물 실용화 연구는 주관기관과 협동기관이 공동으로 연구를 수행하고자 한다.

기관	연구 개발 최종 목표	연구 개발 내용
제노마인(주) (주관기관)	다수성 형질 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정	<ul style="list-style-type: none"> · 기 확보된 유용 유전자의 기능 재검정 (<i>ATPG3, ATPG4, ATPG7, ATPG8</i>) · Chromatin architecture 조절을 통한 다수성 형질 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 변이체 표현형 분석 및 분자·생리·생화학적 기능 조사 - 유용 유전자에 대한 loss-of-function, gain-of function 애기장대 변이체 표현형 및 기능 분석 - 생산성 증대 지표 분석을 통한 다수성 형질확인
	유용 유전자가 도입된 콩 형질전환체 생산	<ul style="list-style-type: none"> · 유용 유전자의 콩 도입 및 형질전환체 생산 - 유용 유전자의 콩 도입을 위한 특허회피 vector construct 제작
	다수성 우량 콩 형질전환체 기능 분석	<ul style="list-style-type: none"> · 기능 분석을 통하여 다수성 목표 형질을 가진 우량 콩 형질전환체 개발 - 형질전환 콩의 2차 기능 분석 (목표 형질에 대한 생리·생화학적 분석)
	우량 형질전환체의 GM 작물 실용화 탐색	<ul style="list-style-type: none"> · GM 작물 실용화 탐색: <ul style="list-style-type: none"> - 특허 회피 벡터 제작, 벡터 시스템 점검, 도입 유전자의 안정성 점검 등 - 형질전환체 실용화를 위한 국내 종자회사와의 협의 및 마케팅
	지적소유권 확보	<ul style="list-style-type: none"> · 특허출원 7건, 특허등록 3건
동아대 (협동기관)	유용 유전자가 도입된 콩 형질전환체 생산	<ul style="list-style-type: none"> · 유용 유전자의 콩 도입 및 형질전환체 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 유용 유전자의 콩 도입을 위한 발현 vector 제작 - 콩 형질전환 수행 - 형질전환 콩의 1차 기능 분석: 유전자 도입 및 발현 분석 - 형질전환체 생산
	우량 콩 형질전환체 개발	<ul style="list-style-type: none"> · 기능 분석을 통하여 다수성 목표 형질을 가진 우량 콩 형질전환체 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환 콩의 1차 표현형 분석 - 형질전환 콩의 온실 및 포장시험을 통한 농업 형질 규명
	세대 전개 및 후대 검정	<ul style="list-style-type: none"> · 종자 확보 및 후대 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 선발된 콩 형질전환체의 밀양, 군위 등에서 GMO 포장시험을 통한 농업 형질 규명 - 도입 유전자의 발현량 및 수확량 정밀 분석
	지적소유권 확보	<ul style="list-style-type: none"> · 특허출원 2건, 특허등록 3건, 논문 3건 (SCI학술지 3건)

다. 연차별·세부과제별 연구개발의 목표 및 내용

구분 (연도)	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도 (2012년)	다수성 콩 품종 개발용 유용 유전자 발굴	* 기확보 유전자의 기능 재검정 * 유용 유전자 2종 발굴 * 형질전환용 벡터 제작	- 다수성 형질 관련 기확보 유전자의 기능 재검정: <i>ATPG3, ATPG4, ATPG7, ATPG8</i> (총 4종) - 다수성 형질 관련 신규 유용 유전자(신규 1, 2) 발굴 및 기능 검정 (2종) - 기확보 및 신규 1, 2 유전자의 콩에 대한 형질전환용 벡터 제작 (총 6건)
	다수성 우량 콩 형질전환체 개발	* 콩 형질전환체 4종 생산	기확보 유전자 형질전환 및 형질전환체 생산 (4종) - 콩 형질전환 - 형질전환체 도입 유전자 확인 - 형질전환체 종자 생산 (4종)
2차년도 (2013년)	다수성 콩 품종 개발용 유용 유전자 발굴	* 유용 유전자 2종 발굴 * 형질전환용 벡터 제작	- 다수성 형질 관련 신규 유용 유전자(신규 3, 4) 발굴 및 기능 검정 (총 4종) - 신규 1, 2, 3, 4 유전자의 콩에 대한 형질 전환용 벡터 제작
	다수성 우량 콩 형질전환체 개발	* 콩 형질전환체 4종 생산 * 콩 형질전환체 기능 검정	신규 유전자 형질전환 및 형질전환체 생산 (총 8종) - 콩 형질전환 - 형질전환체 도입 유전자 확인 - 형질전환체 종자 생산 (4종) 형질전환체 기능 검정 - 1차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 1차 기능 검정 - 1차년도 생산 콩 형질전환체 포장 전개
3차년도 (2014년)	다수성 콩 품종 개발용 유용 유전자 발굴	* 유용 유전자 1종 발굴 * 형질전환용 벡터 제작	- 다수성 형질 관련 신규 유용 유전자(신규 5) 발굴 및 기능 검정 (총 5종) - 신규 5 유전자의 콩에 대한 형질전환용 벡터 제작
	다수성 우량 콩 형질전환체 개발	* 콩 형질전환체 1종 생산 * 콩 형질전환체 기능 검정 * 포장 실험	신규 유전자 형질전환 및 형질전환체 생산 (총 9종) - 콩 형질전환 - 형질전환체 도입 유전자 확인 및 종자 생 산 (1종) 형질전환체 기능 검정 - 1차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 2차 기능 검정 - 2차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 1차 기능 검정 우량 콩 형질전환체의 농업적 특성 분석 - 포장 전개 및 증식 - 수확 조사

구분 (연도)	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
4차년도 (2015년)	다수성 콩 품종 개발용 유용 유전자 발굴	<ul style="list-style-type: none"> * 유용 유전자 1종 발굴 * 형질전환용 벡터 제작 	<ul style="list-style-type: none"> - 다수성 형질 관련 신규 유용 유전자(신규 6) 발굴 및 기능 검정 (총 6종) - 신규 6 유전자의 콩에 대한 형질전환용 벡터 제작 - <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>에서 형질전환체 특성 분석
	다수성 우량 콩 형질전환체 개발	<ul style="list-style-type: none"> * 콩 형질전환체 1종 생산 * 콩 형질전환체 기능 검정 (주관 공동) 	<p>신규 유전자 형질전환 및 형질전환체 생산 (총 10종)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 콩 형질전환 - 형질전환체 도입 유전자 확인 및 종자 생산 (1종) <p>형질전환체 기능 검정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 포장 시험 - 2차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 2차 기능 검정 - 3차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 1차 기능 검정
5차년도 (2016년)	다수성 콩 품종 개발용 유용 유전자 발굴	<ul style="list-style-type: none"> * 유용 유전자 추가 기능 검정 	<ul style="list-style-type: none"> - 발굴한 유용 유전자에 대한 다수성 형질 관련 추가 기능 검정 - <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i>에서 형질전환체의 다수성 목표형질 분석
	다수성 우량 콩 형질전환체 개발	<ul style="list-style-type: none"> * 콩 형질전환체 기능 검정 및 우량 형질전환체 개발 (주관 공동) * GM 작물 실용화 연구 (주관 공동) 	<p>형질전환체 기능 검정 및 우량 콩 형질전환체 개발 (2종)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 포장 시험을 통한 농업 형질 규명 - 2차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 포장 시험 - 3차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 2차 기능 검정 - 4차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 1차 기능 검정 <p>GM 작물 실용화 연구: 형질전환체 개발 (2종)</p> <ul style="list-style-type: none"> - GM 작물 형질전환체 선별 및 개발 - 이벤트 선발 단계 직전까지 완료 예정

제 3 절. 평가의 착안점 및 기준

년도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 척도
1차년도 (2012년)	○ 다수성 형질 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정	50%	- 기 확보된 유전자 4종에 대한 기능 재검정 여부 - 신규 유용 유전자 2종 발굴 및 기능 검정 여부 - 기 확보 유전자 4종에 대한 콩 형질전환용 벡터 construct 제작 여부
	○ 콩 형질전환체 생산 및 개발	30%	- 기 확보 유전자 4종에 대한 형질전환 및 형질전환체 생산 여부 (유전자당 20개체 이상)
	○ 지적소유권 확보	20%	- 2건의 특허 출원/등록 여부
2차년도 (2013년)	○ 다수성 형질 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정	40%	- 신규 유용 유전자 2종 발굴 및 기능 검정 여부 - 신규 유용 유전자 4종에 대한 콩 형질전환용 벡터 construct 제작 여부
	○ 콩 형질전환체 생산 및 개발	40%	- 신규 유전자 4종에 대한 형질전환 및 형질전환체 생산 여부 (유전자당 20개체 이상) - 1차년도에 생산된 형질전환체에 대한 1차 기능 검정 여부
	○ 지적소유권 확보	20%	- 3건의 특허 출원/등록 여부 - 1건의 SCI급 학술지 게재 여부
3차년도 (2014년)	○ 다수성 형질 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정	30%	- 신규 유용 유전자 1종 발굴 및 기능 검정 여부 - 신규 유용 유전자 1종에 대한 콩 형질전환용 벡터 construct 제작 여부
	○ 콩 형질전환체 생산 및 개발	50%	- 신규 유전자 1종에 대한 형질전환 및 형질전환체 생산 여부 (유전자당 20개체 이상) - 1차년도에 생산된 형질전환체에 대한 2차 기능 검정 여부 - 2차년도에 생산된 형질전환체에 대한 1차 기능 검정 여부
	○ 지적소유권 확보	20%	- 3건의 특허 출원/등록 여부 - 1건의 SCI급 학술지 게재 여부
4차년도 (2015년)	○ 다수성 형질 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정	30%	- 신규 유용 유전자 1종 발굴 및 기능 검정 여부 - 신규 유용 유전자 1종에 대한 콩 형질전환용 벡터 construct 제작 여부
	○ 콩 형질전환체 생산 및 개발	50%	- 신규 유전자 1종에 대한 형질전환 및 형질전환체 생산 여부 (유전자당 20개체 이상) - 1차년도에 생산된 형질전환체에 대한 포장시험 (I) 여부 - 2차년도에 생산된 형질전환체에 대한 2차 기능 검정 여부 - 3차년도에 생산된 형질전환체에 대한 1차 기능 검정 여부
	○ 지적소유권 확보	20%	- 3건의 특허 출원/등록 여부 - 1건의 SCI급 학술지 게재 여부
최종 평가 (2016년)	○ 다수성 형질 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정	40%	- 기 확보된 유전자 4종에 대한 기능 재검정 여부 - 신규 유용 유전자 6종 발굴 및 기능 검정 여부 - 기 확보 및 신규 유용 유전자 10종에 대한 콩 형질전환용 벡터 construct 제작 여부 - 특허회피 벡터 construct 제작 및 형질전환체 기능 분석 여부
	○ 콩 형질전환체 생산 및 개발	40%	- 기 확보 및 신규 유용 유전자 10종에 대한 형질전환 및 형질전환체 생산 여부 (유전자당 20개체 이상) - 생산된 콩 형질전환체 7종 이상에 대한 기능 분석 여부 - 다수성 농업 형질을 지닌 우량 콩 형질전환체 2종 개발 여부 - 특허회피 벡터 construct를 도입한 형질전환체 기능 및 표현형 검정 확인 여부 (2종)
	○ 지적소유권 확보	20%	- 15건의 특허 출원/등록 여부 - 3건의 SCI급 학술지 게재 여부

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

제 1 절. 국내 현황: 개념 정립 단계

콩 형질전환 기술: 국내에서 콩 형질전환 기술 개발을 위한 연구가 농촌진흥청을 비롯한 몇 개의 대학, 연구소를 중심으로 2000년대에 들어서 본격적으로 수행되었다.

그중 바이오그린 21사업과 프론티어 작물유전체 사업, 그리고 농림기술개발사업에서 콩 형질전환을 이용한 식물체 생산연구가 제안되었고, 이들 과제를 통하여 콩 형질전환에 대한 국내 기술이 축적되기 시작하였으나, 여전히 연구결과의 학술지 publication은 몇 개가 되지 않을 정도로 미미한 형편이었고 특히 해외 우수논문에 투고된 경우는 최근까지 전무한 실정이었다. 그러던 중 본 과제에 참여한 동아대 연구팀이 베타카로틴이 증가된 콩 형질전환체 생산 연구로 국내 최초로 해외 유명저널인 PLoS ONE에 논문이 게재 결과를 얻었으며, RNAi를 이용한 SMV 저항성 관련 논문 또한 게재되는 결과를 얻었다. 그 외에 내염성, 내건성 형질전환체 생산이 완료되어 현재 논문투고 준비 중이다. 지난 수년간 국내 연구자들에 의해 개발된 농업적 잠재성을 가지는 유전자가 동아대 연구진에 의해 무료로 형질전환 서비스가 수행되어왔으며, 지금까지 약 40종의 유전자가 도입되어 형질전환 식물체가 만들어 졌다.

최근 국내에서도 GM 작물 개발을 위한 형질전환용 벡터 시스템의 개발에 대한 관심과 연구가 증대되고 있는데, 그 예로서 한국생명공학연구원 연구팀은 유전자 벡터 내 element들을 모두 고구마 유래 element들로 바꾸어 고구마 형질전환에 이용하는 intragenic vector system을 개발하고 있는 것으로 알려졌으며, 명지대학교 연구팀도 자체 벡터 시스템을 구축하고 있는 것으로 파악되었다. 따라서 국내 GM 작물 개발 연구에서 작물 형질전환에 앞서 사용할 유전자 벡터 연구 개발의 필요성이 크게 증대되어 향후 연구가 빠르게 진행될 것으로 여겨진다.

유전자 발굴 기술: 유전자 발굴 기술에 있어서 다양한 스트레스 저항성에 대한 유전자 발굴 분야가 다소 기복을 보이나 다른 분야에 비해 연구 활동이 활발한 것으로 나타나는 반면, 다수성 형질에 대한 연구 활동은 비교적 저조한 것으로 나타났다. 그러나 최근 GM 작물 개발의 중요성이 인식되면서부터 다수성 형질에 대한 연구가 급속도로 증가하고 있다.

이러한 다수성 형질을 지닌 유전자를 도입한 우량 작물 개발이 벼 등에서는 꾸준히 진행되고 연구 성과도 가시화되고 있으나 여전히 콩에 있어서는 연구 개발이 제한적인 실정이다.

제 2 절. 국외 현황: 상품 개발 및 상용화 단계

콩 형질전환 기술: 미국은 콩 형질전환 기술 개발을 1980년대부터 시작하여 가장 먼저 형질전환 기술이 확보되었고 상업적으로 이용 가능한 많은 유전자의 도입이 시도되어 생산되고 있다.

확보하고 있는 형질전환 기술을 고효율로 진보시키기 위하여 실험적으로는 대학과 기업체에서

높은 효율의 콩 형질전환 기술개발을 위하여 지속적인 연구가 진행되었고 그 결과 매우 높은 형질전환 기술이 개발되었다(Olhof et al., 2003; Paz et al., 2005).

형질전환용 벡터 개발의 경우, 다국적 기업이 대학 혹은 연구기관과 공동 연구를 통하여 벡터 개발에 집중하고 있으며, 이러한 연구는 모두 특허 등과 같은 지적소유권으로 권리를 확보하고 있다. 따라서 다국적 기업이 확보하고 있는 벡터의 권리를 회피할 수 있는 형질전환용 벡터 시스템의 확보가 필수적이라 할 수 있다.

GM 작물의 상용화: 1980년대부터 미국을 중심으로 기술개발이 꾸준히 진행되어 많은 유전자의 도입이 형질전환을 통하여 시도되었고 그 중에서 제초제 저항성(glyphosate)과 해충저항성(BT toxin) 유전자 도입된 콩이 전 세계적으로 보급되어 재배되고 있다(Padgette et al., 1995; Stewart et al., 1996).

GM 작물 개발에 있어서 GM작물 1세대는 식용/사료작물의 생산성 증대에 중점을 두었으며, 2세대는 바이오연료용 에너지작물의 효율 증대에 집중하고 있고, 향후 3세대는 의약품, 경구 백신 등의 특화된 신기능성 원료로의 개발로 발전해 나갈 것으로 예측된다. 하지만 여전히 식량 및 사료로서의 수요 증가를 해결하기 위해서 다수성 GM 작물 개발에 집중하고 있는 실정이다.



Monsanto의 다수성 및 스트레스 저항성 작물 개발에 대한 2030 project.

다국적 종자 기업, 특히 Monsanto와 BASF 등은 경작지 감소, 노동력 부족 및 농약과 비료 등의 투입비용 증가 현상과 개발도상국가들의 경제성장에 따라 식량 및 사료로서의 수요 증가로 콩을 중심으로 집중적으로 GM 작물 개발을 시도하고 있다(그림 참조).

유전자 발굴 기술: 농업 선진국 및 다국적 종자 기업들은 우량 콩 품종 개발을 위하여 도입 목표형질로 다수확성, 그리고 기후변화 대응에 집중하여 연구하고 있다.

최근 *Medicago truncatula*와 콩의 게놈 염기서열이 밝혀짐에 따라 급속도로 콩의 유용 유전자 발굴에 대한 연구가 집중되고 있다.

제 3 절. 국내·외 연구현황 비교 및 필요 연구 분야

GM 작물 개발에 있어서 글로벌 종자시장에 진출 가능한 다수성 GM 콩 품종 개발은 고효율 콩 형질전환 시스템 확보, 다수성 목표 형질 발현 유전자의 지적 소유권 확보, 그리고 형질전환용 벡터 시스템의 특허 회피 혹은 최소화가 필요하다.

콩 형질전환 시스템: 본 연구팀은 국내 콩 품종, 광안콩을 재료로 한 고효율 형질전환체계 확립 및 유용 유전자 도입, 그리고 형질전환체의 생산이 가능하고 형질전환체 생리분석, 목표형질 확인, 후대 전개 및 선발, 그리고 농업형질 확인 등 일련의 과정을 체계적으로 확립하고 있다.

도입 유전자의 지적소유권: 다수성 우량 GM 콩 품종 개발에 적용되는 확보 유전자 4종은 모두 다수성에 대한 목표 형질을 가지고 있으며, 일부 작물에서의 기능검정 결과 유사한 결과가 얻어지고 있다. 따라서 확보하고 있는 4종의 유전자 도입은 다수성 우량 GM 콩 품종 개발이 가능하게 하리라 판단된다. 상기에서 언급한 유전자 4종은 제노마인(주)에서 국내외 특허출원/등록을 통하여 원천기술을 확보하고 있고, 추후 발굴되는 유전자 역시 특허출원/등록을 통하여 지적소유권을 확보할 예정이므로 이후 GM 작물의 실용화에도 전혀 문제가 없는 것으로 판단된다.

형질전환용 벡터 시스템: 본 연구팀은 노화관련 유전자인 SEN1의 inducible promoter를 도입하여 pCSEN 벡터를 개발하였다. pCSEN 벡터는 식물의 발달 단계에서 인위적으로 유전자 발현 조절이 가능하고 다양한 스트레스에 대해서도 유전자 발현이 가능하므로 형질전환용 벡터로서의 가치가 충분하리라 판단된다. SEN1의 inducible promoter는 특허에 대한 문제가 없이 상용적으로 사용이 가능하고, 현재 국내연구진(명지대/전남대 연구팀)들에 의해 개발된 특허 회피 벡터들도 사용하여 연구를 수행하면 특허 회피 혹은 최소화가 가능할 것으로 보인다.

최근 유럽연합도 미래의 기후변화와 환경보존을 위해 GM작물을 21세기의 주된 품종생산의 수단으로 보고 있어 국내에서 이 연구의 활성화와 산업적 기반을 구축하는 것이 매우 시급할 것으로 생각된다.

제 3 장. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

제 1 절. 연구수행 내용 및 방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
다수성 형질 유용 유전자 발굴 및 기능 검정	Plant functional genomics Homology approach	· Advanced RAM approach, Activation tagging, Promoter trapping 등 · 다수성 관련 변이체 선별 (주1) · 유전자 기능 분석 (주2) · 애기장대 및 다른 식물의 AT-hook motif를 가진 유전자의 homology approach (주3)
형질전환체 생산	콩 형질전환용 벡터 콩 형질전환	· 콩 형질전환용 벡터 construct 제작 (주4) · 콩 형질전환 및 형질전환체 생산 (주5)
형질전환체 기능 분석	형질전환체 유전자 도입 및 발현 분석 형질전환체 기능 분석	· gPCR/Southern 분석, RT-PCR/qRT-PCR 등 (주6) · 형질전환체의 목표 형질 분석 (다수성, 스트레스 저항성, 녹기연장 (주7) · 형질전환체의 다수성에 대한 농업형질 분석 (주7)

(주1) Plant Functional Genomics

모델 식물은 애기장대로 하며, activation tagging, promoter trap, advanced RAM approach 등과 같은 기능성 유전체 연구를 통하여 확보된 다량의 변이체로부터 다수성 형질 관련 유용 표현 형질을 지닌 변이체를 확보한다. 이때 activation tagging 기법을 통하여 확보된 변이체는 주로 gain-of-function 변이체로 다수성 형질에 관한 positive regulator와 관련된 유용 유전자의 발굴에 많은 장점을 가지고 있는 반면, advanced RAM approach와 promoter trap 기법을 통하여 확보된 변이체는 주로 loss-of-function 변이체로 다수성 형질에 관한 negative regulator와 관련된 유용 유전자의 발굴에 많은 장점을 가지고 있다. 이러한 민감성 유전자의 인위적 발현 억제제는 작물의 스트레스 저항성 제공에 많은 기회를 제공할 것이다.

(주2) 유전자 기능 분석

확보된 다수성 형질 관련 변이체로부터 각 기법에 적절한 방법을 통하여 유전자 정보를 확보하고 이중 chromatin architecture 조절과 관련된 신기능성 유용 유전자를 선별한다. 일반적으로 activation tagging 변이체 pool에서 확보된 변이체의 유전자 분리는 주로 TAIL-PCR을 수행하여 얻어지며, promoter trapping 변이체 pool에서 확보된 변이체의 유전자 분리는 plasmid rescue를 통하여, 그리고 advanced RAM 변이체 pool에서 얻어진 변이체의 유전자 분리는 inverse PCR을 통하여 얻어진다. 선별된 유전자의 기능을 재검정하기 위하여 reverse genetics를 적용한다. 이러한 연구를 통하여 얻어진 유전자의 gain-of-function과 loss-of-function 변이체의 표현형을 재확인하고, 그들의 표현 형질에 대한 생리·생화학적 현상을 구명한다. 특히 reverse genetics를 통하여 얻어진 변이체의 생리·생화학적 연구는 그 분야의 전문가에게 많은 자문과, 가능하면 공동연구를 통하여 유전자의 기능을 강화하고자 한다.

(주4) 콩 형질전환용 벡터 construct 제작

기본적으로 쌍자엽 식물인 콩에 적용 가능하고 형질전환체 선별에 있어서 보다 용이한 제초제를 선발마커로 사용 가능한 Gateway vector system을 가진 pB2GW7.0 vector를 사용하고자 한다. 이러한 벡터는 constitute promoter인 CaMV 35S promoter를 적용하고 있다. 본 연구팀은 발아 혹은 발달 초기 특정 유전자 과발현에 의한 표현형적 변이가 나타나면, promoter의 활성이 보다 약하고 발달단계동안 조절이 가능한 스트레스 inducible promoter인 SEN1 promoter를 적용한 pCSEN 벡터를 사용하고자 한다. pCSEN 벡터의 SEN1 promoter는 DGIST 남홍길 박사가 발굴한 promoter로 특허출원 없이 국제 학술지에 논문으로 게재한 상태로 특허의 GM 작물 실용화 연구에 적용이 가능하다. 또한 SEN1 promoter는 식물의 발달 단계 중 노화관련 promoter이기 때문에 식물의 발달 초기에는 정상적 생육을 유지할 수 있는 장점이 있고, 본 연구팀에서 발굴하는 유전자의 활성은 최고 발현 조건이 아닌 최적 발현 조건을 요구하기 때문에 본 벡터의 사용은 우량 품종 개발에 보다 많은 장점을 제공하리라 판단된다(그림 6, 왼쪽). 또한 본 연구팀은 최근 전남대 김정일 박사가 개발한 특허 회피/최소화 벡터(발현량의 적정수준 조절, pCAMBIA3301 벡터보다 발현량이 적음)도 GM 콩 품종 개발에 적용하고자 한다(그림 6, 오른쪽).

(주5) 콩 형질전환 및 형질전환체 생산

침지해 놓은 종자의 양 떡잎 사이로 scalpel를 넣어 하배축까지 수직으로 자르고 종피를 제거하였다. Hypocotyl을 떡잎 밑 약 1 cm되는 곳에서 자른 후 embryonic axis가 붙어있는 한 쪽을 scalpel로 7-8회 정도 상처를 내었다. 이 때 scalpel에 5 mL 농축액을 묻힌 다음 target 부위에 상처를 내었다. 대략 50개 정도의 explant를 15 mL co-cultivation/A. tumefaciens에 넣고 sonication 20초, 데시게이터와 다이어프램 펌프(GAST사)를 이용해 vacuum 30초 (500 mm. Hg) 처리를 한 뒤 30분 동안 접종시켰다. Explant를 tube에서 꺼내 멸균한 filter paper위에 놓고 물기를 제거한 뒤, filter paper를 한 장 깔고 10 개체를 올려두었다(adaxial side down). Micropore로 봉한 뒤 25 °C, 18시간 광주기에 5일 동안 공배양하였다.

5일간 co-cultivation 후에 제균을 위해서 cefotaxime 250 mg/L, vancomycin 50 mg/L 그리고 ticarcillin 100 mg/L을 사용하였으며, 이 후 explant를 filter paper 위에 놓고 물기를 제거한 뒤 선발항생제가 없는 SI(shoot induction)-① 배지에 한 plate당 5개체씩 hypocotyl 부분이 배지에 고착되고 재분화 될 부분이 30° 정도의 각도로 flat side가 위로 향하도록 치상하였다. 각각의 plate를 micropore로 봉한 뒤 25°C, 18시간 광주기에서 배양시켰다. 2주 후 shoot이 나온 explant를 선발항생제 PPT 10 mg/L가 들어있는 SI-② 배지에 치상하였는데, 이때 shoot을 제외한 나머지 부분은 잘라버리고 adaxial side down으로 치상하였다. 2주 후 갈변한 shoot/shoot pad는 scalpel로 깎아 선발항생제 PPT 5 mg/L가 들어있는 SEM(shoot elongation medium) 배지에 치상하였다. 2주마다 새로운 SEM 배지로 옮겨주면서 shoot의 갈변부위는 덜 뽕족한 scalpel 윗면으로 쳐서 제거하고 shoot pad는 조금씩 계속 깎아내어 배지가 잘 흡수되도록 하였다. 이후 선발을 거치면서 신장된 shoot가 4 cm 이상일 때 RM 배지에서 뿌리 분화를 유도하였다.

1~2주가 경과한 후 2개 이상의 뿌리가 나오면 3차 증류수로 배지를 씻어내고 상토와 버미큘라이트를 2:1로 섞어 넣은 small pot(6 cm × 6 cm × 5.6 cm)에 심었다. 이 small pot는 다시 Magenta box 안에 넣어 25°C, 18시간 광주기에서 생장시켰다. 10일 정도 경과 후 잎 표면에 100 mg/L DL-PPT로 leaf painting을 하였다. Leaf painting으로 유전자 도입을 확인한 식물체를 big pot로 옮겨 심고 투명한 플라스틱 덮개에 2, 4, 10개의 구멍을 만들어 3일 마다 개수가 적은 것에서부터 많은 것으로 바뀌어서 씨웠다. 10일 후 식물체에 basta(BAYER사)처리를 하고 단일처리(8시간 명조건, 16시간 암조건, 종이 box 이용)로 화아 분화를 유도하여 개화시켰다. Basta 처리를 하여 저항성을 나타내는 형질전환체를 온실로 옮기고 종자를 수확한다.

(주6) 형질전환체 유전자 도입 및 발현 분석

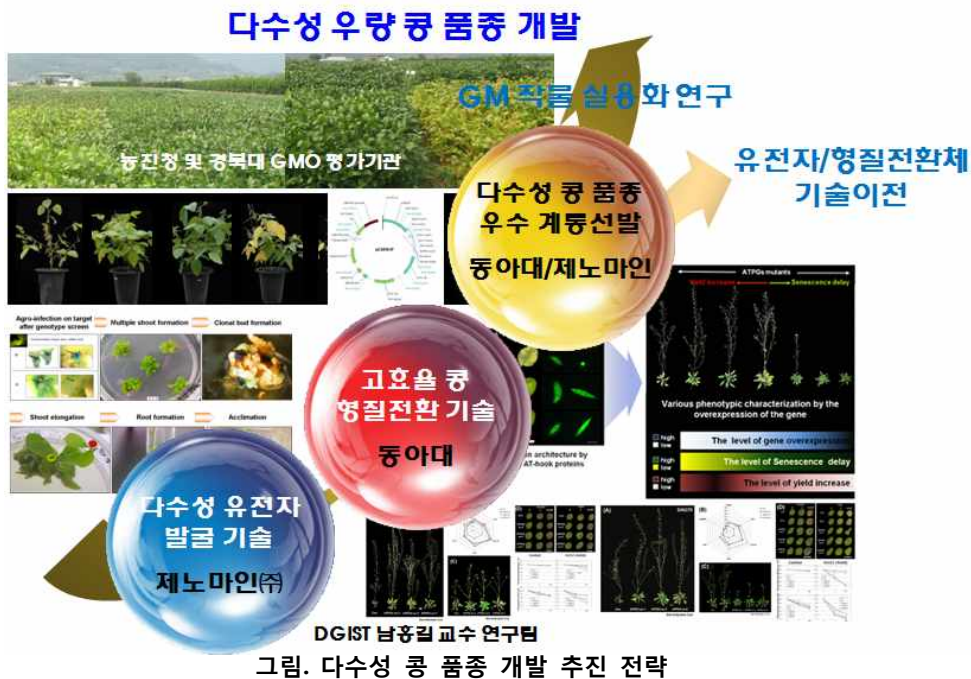
제조제 PPT로 선별된 형질전환 콩은 일차적으로 genomic PCR 기법 혹은 Southern blot /RT-PCR을 통하여 유전자 삽입 및 삽입 수를 확인하고, RT-PCR, qRT-PCR 혹은 Northern blot을 통하여 도입 유전자의 발현을 확인한다. 그리고 도입 유전자의 삽입 부위는 plasmid rescue, 다양한 PCR 기법 등을 통하여 확인한다.

(주7) 형질전환체 기능 분석

확인한 형질전환 식물체로부터 종자를 수확한 후, T₁ screening을 통하여 표현형질을 분석한다. 다수성 형질에 대한 우선 식물 생육 활성과 관련된 사항으로 엽록소 함량과 광합성 효율(Fv/Fm)을 측정하며 또한 분자생물학적 분석은 생육 활성 관련 유전자를 indicator로 하여 유전자 발현을 분석하여 조사하고, 이후 다수성 목표형질을 확인하기 위하여 yield parameter 분석을 수행한다. 이와 더불어 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 변이체를 다양한 스트레스 조건(drought stress, cold stress, salt stress, oxidative stress, etc)하에 일정 기간 방치한 후 그들의 표현형적 특징 및 생리.생화학적 특성을 조사하고자 한다. 이후 형질전환체는 온실 및 간이 포장 검정을 통하여 이러한 형질로 인하여 다수성 형질이 유발되었는지를 광합성 효율, 개체 생존율, 바이오매스 증가, 종자 수확량 증가 혹은 종자 크기의 증가 등과 같은 yield parameter 분석을 통하여 실용화의 가능성을 탐색할 예정이다. 또한 재배환경에서 숙기 지연 등 예상하지 못한 역기능 및 부정적 영향 발생 가능성에 대한 분석도 수행하여 그들의 조절 기작을 밝히고자 한다. 이와 같은 표현형 검정을 통해 선별된 형질전환체들의 생리.생화학적 기능 분석을 통하여 2종의 다수성 농업 형질을 나타내는 콩 형질전환체를 개발하고, 이들에 대한 GM 작물 실용화 연구를 수행하고자 한다.

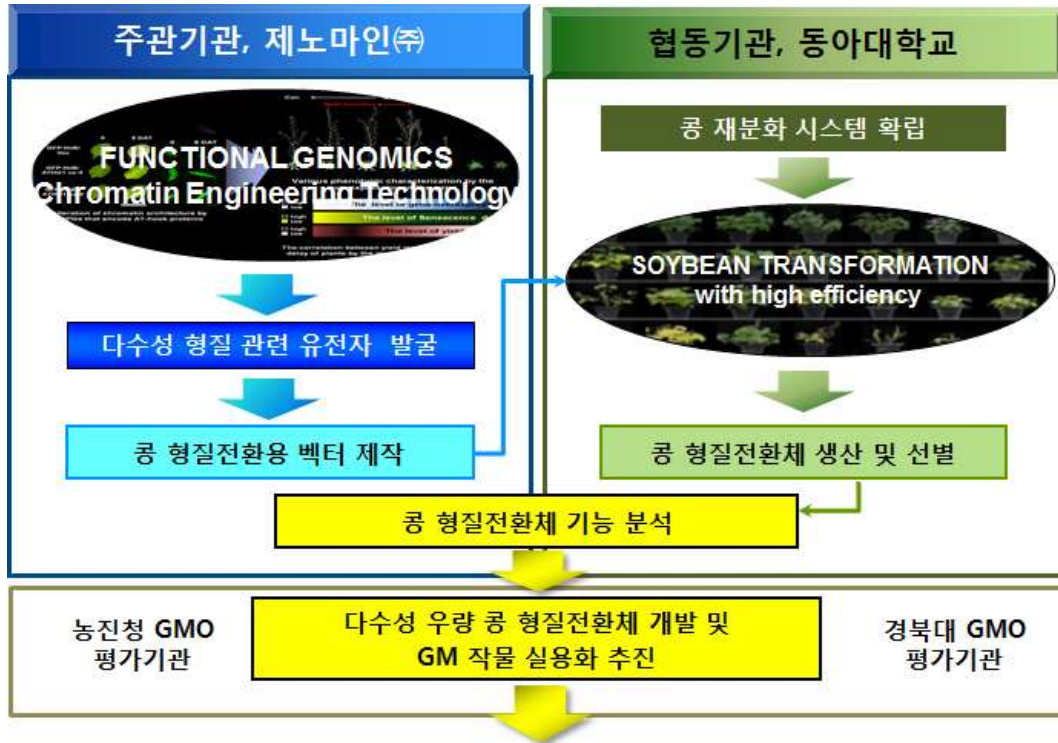
제 2 절. 연구개발 추진 전략

다수성 작물 개발에 있어서 가장 핵심은 다수성 목표 형질을 제공할 수 있는 기술 개발과 작물에 대한 형질전환 및 형질전환체 개발 기술이다. 주관 기관인 제노마인(주)는 다양한 기능성 유전체 연구를 통하여 chromatin architecture 조절기술을 개발하고 이에 관련된 다수성 목표 형질을 제공하는 유용 유전자를 발굴하여 다수성 농업 형질을 나타내는 콩 품종 개발하는데 적용하고자 한다. 이러한 유용 유전자 발굴 및 기능 검정에 있어서 보다 효과적인 시스템을 구축하기 위하여 chromatin architecture 조절 기술과 다수성 목표 형질의 상관관계에 대해서는 DGIST 남홍길 교수 연구팀과 협조 체제를 구축하여 정확한 조절 시스템을 규명하고자 한다.



한편, 콩 형질전환 및 형질전환체 개발은 본 사업의 협동기관인 동아대에서 수행하고 있다. 협동기관인 동아대는 콩 형질전환 및 형질전환체 개발에 관한 연구를 수행하며, 형질전환체의 기능 검정 및 특성 분석은 주관기관인 제노마인(주)와 협동기관이 공동으로 수행하여 정확한 목표 형질을 분석하고자 한다. 이후 개발된 콩 형질전환체는 농촌진흥청 GMO 평가기관과 경북대학교 GMO 평가기관과의 협력체제를 구축하여 포장시험을 수행하여 형질전환체의 농업형질을 분석하고 우량 형질전환체의 GM 품종 실용화를 추진하고자 한다. 이러한 협력체제는 연구 산물의 최적화와 상업화에 있어 많은 장점을 제공하리라 판단된다(그림).

제 3 절. 연구개발 추진 체계



- 1) 모델식물인 *Arabidopsis*에서 유용성이 검증된 chromatin architecture 조절 유전자 (AT-hook domain을 가지는 유전자로 노화시기에 chromatin의 안정성을 제공하여 다수성 목표형질을 가짐) 4종을 기 확립된 형질전환 기술을 이용하여 콩에 도입하고,
- 2) 또한 chromatin architecture 조절을 통한 다수성 목표형질을 지닌 유용 유전자 6종을 새로이 발굴·분리하여 콩에 도입하고자 한다(총 10종의 형질전환체 생산).
- 3) 생산된 콩 형질전환체 7종 이상을 대상으로 다수성 목표형질에 대한 기능분석을 실시하여 2종의 다수성 목표형질을 지닌 우량 콩 형질전환체를 개발하고,
- 4) 개발된 우량 형질전환체를 포장시험을 통하여 다수성 농업 형질을 지닌 우량 콩 품종 개발에 적용하고자 한다(2종).
- 5) 개발된 우량 형질전환체에 대한 품종 개발은 추후 GM 작물 실용화 연구를 통하여 추진하며 본 사업동안의 추진 단계는 형질전환체 개발까지를 수행한다.

제 4 절. 연구개발 결과

가. 기확보 유전자의 기능 재검정

1) 기확보 유전자의 기능 재검정

본 사업에 적용된 기확보 유전자는 *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7* 그리고 *ATPG8*이며, 이들은 공통적으로 녹기 연장 및 다수성에 대한 표현형질을 제공하고, 또한 건조 및 산화 스트레스에 대하여 저항성 형질을 제공한다. 특히 *ATPG3* 및 *ATPG4* 유전자는 녹기 연장 및 다수성에 대한 표현형질이 강한 반면, *ATPG7*과 *ATPG8*은 다수성 및 스트레스 저항성에 대한 표현형질이 강한 것으로 나타났다.

우리는 상기 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체가 다수성에 대한 표현형질을 가지는지를 확인하기 위하여 생산성 증대에 대한 분석을 수행한 결과, 상기 유전자 4종에 대한 과발현 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 1.5배 이상의 종자 생산이 증가하는 것으로 나타났으며, 종자 1,000개의 무게는 약간의 차이는 있으나 거의 대부분이 대조구와 비슷한 것으로 나타났다. 그리고 장각과 수의 경우, 대부분의 변이체들은 종자 생산의 증가와 비례하여 장각과 수의 증가 패턴을 가졌다. 이러한 사실로 미루어보아 상기 유전자 4종의 과발현은 종자 크기와 무관하며, 장각과 수의 증가를 유발하여 종자 수확량 증가를 가지는 것으로 사료된다. 더불어 생체량과 생체 건량에 있어서도 상기 유전자 4종에 대한 과발현 변이체는 대조구에 비하여 뚜렷한 증가 현상을 가졌다. 따라서 본 유전자의 콩 품종 개발에 대한 적용은 다수성 형질 및 바이오매스 증대와 같은 생산성 증대 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 확신하며, 상기 유전자 4종에 대한 콩 형질전환용 벡터를 제작하여 다수성 콩 형질전환체 개발을 진행하고 있다.

2) 기확보 유전자의 추가 기능 분석: 유전자 발현 조절 및 **hormone signaling**에 대한 분자생물학적 기작 규명

우리는 앞서 상기 유전자들은 그들의 발현 정도에 따라 녹기 연장 혹은/그리고 다수성 형질을 제공한다고 보고하였다. 다수성 형질과 유전자 발현 정도의 상관관계를 확인하기 위하여 우리는 *ATPG4* 유전자에 대한 과발현체를 대상으로 유전자 발현 및 그들의 표현형적 특징을 조사하였다(그림 1).

표 1. *ATPG4* 와 tubulin 유전자에 대한 RT-PCR용 primer 정보

GENE	Primer Information
<i>ATPG4</i>	E-AT4-F : 5'- CAC CAT GGC GAA TCC ATG GTG GAC AG -3' (26-mer) E-AT4-R : 5'- TTA AAA TCC TGA CCT AGC TTG AG -3' (23-mer)
Tubulin	TUB-F : 5'- CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA -3' (21mer) TUB-R : 5'- TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3' (21mer)

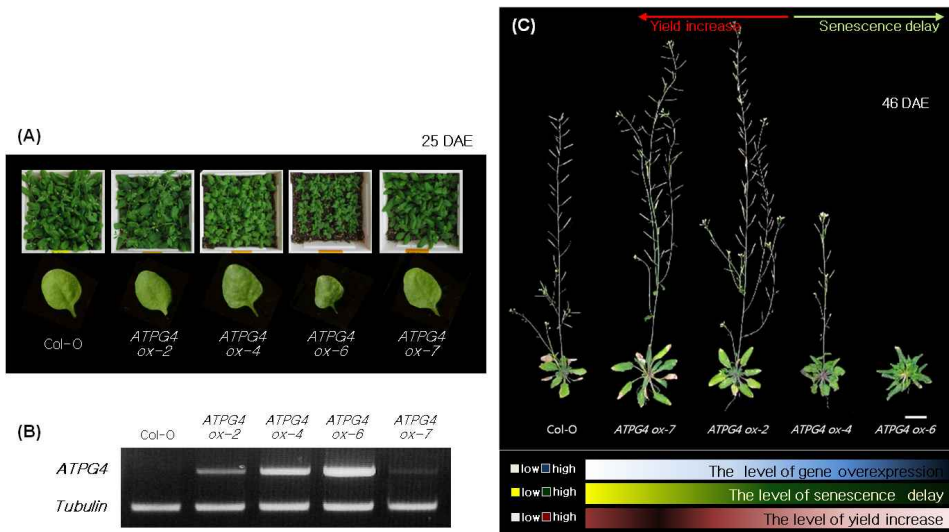


그림 1. *ATPG4* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 표현형적 특징(A, C), RT-PCR을 통한 형질전환체의 *ATPG4*에 대한 유전자 발현, 양성 대조구는 tubulin(B), 그리고 유전자 발현 정도에 따른 다수성 형질과 녹기연장에 대한 상관관계에 대한 모델(C).

선별된 애기장대 과발현 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 자엽 형성 후 25일째, 그리고 46 일째에 수행하였다(그림 1A와 C). 전체적으로 *ATPG4 ox-4*와 *ATPG4 ox-6* 변이체 라인은 애기장대 대조구에 비하여 노화 지연의 표현형적 특징이 강력한 것으로 나타난 반면, *ATPG4 ox-2*와 *ATPG4 ox-7* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, 식물체의 노화 지연 현상보다 개체 크기와 silique 생산량 등의 생산성 증대에 있어서 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌다. 변이체들의 이러한 표현형적 특징이 유전자의 상대적 발현 정도의 차이에 기인하는지를 확인하기 위하여 우리는 자엽 형성 후 25일째의 대조구와 변이체 라인에 대한 유전자 발현 정도를 확인하였다(그림 1B). *ATPG4* 및 tubulin의 유전자 발현 분석을 위한 RT-PCR용 primer 정보는 표 1과 같다. 그 결과, 변이체 4라인 모두 애기장대 대조구에 비하여 *ATPG4* 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인하였으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 *ATPG4* 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다. 흥미롭게도, 노화지연 표현형이 강력한 *ATPG4 ox-4*와 *ATPG4 ox-6* 변이체들은 *ATPG4* 유전자의 상대적 발현 정도가 높은 반면, 개체 크기와 silique 생산량 증가와 같은 다수성의 표현형적 특징을 가지는 *ATPG4 ox-2*와 *ATPG4 ox-7* 변이체는 모두 *ATPG4* 유전자의 상대적 발현 정도가 낮은 것으로 나타났다. 이러한 결과를 종합하여 보면, 우리가 제시한 유전자 발현조절을 통한 녹기연장과 생산성 증대에 대한 모델이 적합하다는 것을 확인할 수 있었다. 즉, *ATPG4* 유전자의 발현 정도에 따라 녹기 연장의 표현형적 특징은 비례적으로 증가하며, 유전자 발현 정도가 상대적으로 낮은 상태에서 적정 범위를 가지면 다수성에 대한 표현형적 특징을 제공한다는 것이다(그림 1C). 이러한 유전자 발현 조절을 통한 다수성 형질은 종자 수확시기가 대조구와 비슷하다는 점에서 다수성 작물 개발에 있어서 보다 많은 장점을 제공하리라 확신한다.

표 2. Cytokinin 생합성에 관여하는 *IPT* 유전자군, *ATPG4* 유전자, 그리고 양성 대조구인 *TUB* 유전자 발현을 위한 RT-PCR용 primer 정보

유전자명	정방향/역방향프라이머 (서열번호)
<i>IPT1</i>	5'-CGC TAC TCG TTT CCC TTC AG-3' 5'-TCG ACC CAG ATG AAA CAA CA-3'
<i>IPT3</i>	5'-CAA ACA ACC ATT GCC TCC TT-3' 5'-GGA CGG ATT CAA TGG AGA GA-3'
<i>IPT5</i>	5'-CAC TCC TGA GGA AAG CCT TG-3' 5'-TCG AGC TCT GGA ACT CCA AT-3'
<i>IPT7</i>	5'-TTG GGT CGA CGT TTC CTT AC-3' 5'-GAC GAT TCT CTC GCT TGG TC-3'
<i>ATPG4</i>	E-AT4-F : 5'- CAC CAT GGC GAA TCC ATG GTG GAC AG -3' (26-mer) E-AT4-R : 5'- TTA AAA TCC TGA CCT AGC TTG AG -3' (23-mer)
Tubulin	TUB-F : 5'- CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA -3' (21mer) TUB-R : 5'- TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3' (21mer)

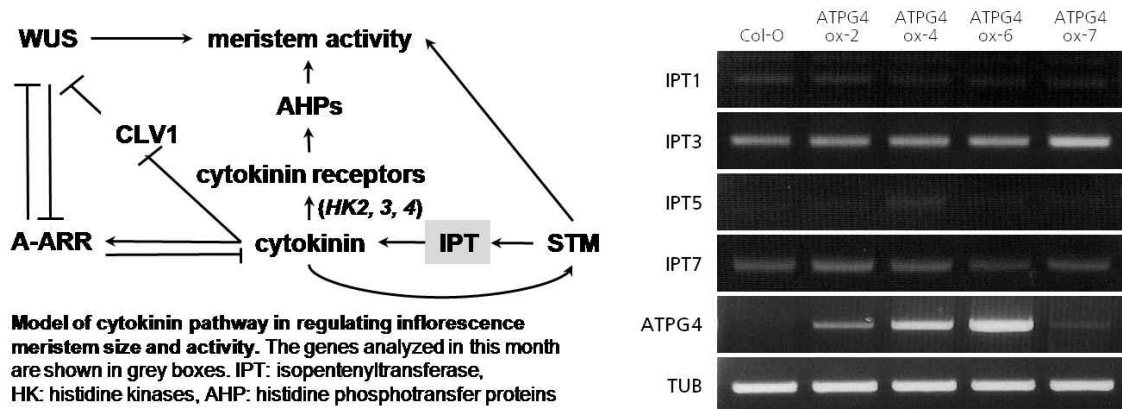


그림 2. *ATPG4* 과발현 애기장대 T_2 형질전환체의 cytokinin biosynthesis pathway에서 *IPT* 유전자군 및 *ATPG4* 유전자에 대한 RT-PCR 결과. 양성 대조구는 tubulin(TUB).

한편 식물호르몬 cytokinin은 식물의 노화를 조절하여 식물 생산성 증가를 유발하고(Gan and Amasino, 1995), 또한 reproductive meristem 활성화, 꽃 크기, ovule 생성을 조절하여 식물의 종자 생산 증가를 유발하는 것으로 알려지고 있다(Bartrina *et al.*, 2011). 우리는 애기장대에서 분리한 *ATPG4* 유전자가 애기장대의 cytokinin 생합성에 관여하는지를 규명하기 위하여 애기장대 cytokinin 생합성 유전자 *IPT*(isopentenyltransferase) 유전자군 중 *IPT1*(AT1G68460), *IPT3*(AT3G63110), *IPT5*(AT5G19040), 그리고 *IPT7*(AT3G23630) 유전자 4종의 발현을 애기장대 야생형과 *ATPG4* 과발현 변이체를 대상으로 조사하였다(그림 2). 적용된 유전자 및 *ATPG4*와 양성대조구인 tubulin에 대한 RT-PCR용 primer 정보는 표 2에서 제시하였다. 그 결과, 대조구에 비하여 변이체에서 *IPT3*과 *IPT5*는 발현 변화의 양상이 *ATPG4*의 발현 변화 양상과 일관성이 없는 반면, 변이체에서 *IPT1*과 *IPT7* 유전자의 발현 변화는 흥미롭게도 *ATPG4*의 발현 변화와 상대적으로 반대되는 양상을 나타내었다. 이러한 사실은 *ATPG4* 유전자가 *IPT1*과 *IPT7* 발현을 조절하여 cytokinin 생합성에 관여한다는 것을 의미한다.

표 3. Cytokinin signaling pathway에서 *CLV1* 유전자, histidine kinase (HK) 유전자군, *ATPG4*, 그리고 양성 대조구 tubulin 유전자에 대한 RT-PCR용 primer 정보

GENE	Primer Information
<i>CLV1</i>	CLV1-RT-F : 5'- ACT TAC CTC TGT CTC CCT CA -3' (20-mer) CLV1-RT-R : 5'- GAC CAC CTT TAG ATC CAT GC -3' (20-mer)
<i>HK3</i>	HK3-RT-F : 5'- CAA CAA CCA GCC CAT ATT CTC -3' (21-mer) HK3-RT-R : 5'- TTC CAA TAC CCA ATC CCC TC -3' (20-mer)
<i>CRE1</i>	WOL-RT-F : 5'- CTG AGG AGC AGT CAT TAT CG -3' (20-mer) WOL-RT-R : 5'- GGT TTT GTT GGG AGA GGA GA -3' (20-mer)
<i>HK2</i>	HK2-RT-F : 5'- GTA TGG CTC AGA AAT TGG GG -3' (20-mer) HK2-RT-R : 5'- GCC AGA GAG GAG AGA TGA AA -3' (20-mer)
<i>ATPG4</i>	E-AT4-F : 5'- CAC CAT GGC GAA TCC ATG GTG GAC AG -3' (26-mer) E-AT4-R : 5'- TTA AAA TCC TGA CCT AGC TTG AG -3' (23-mer)
Tubulin	TUB-F : 5'- CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA -3' (21mer) TUB-R : 5'- TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3' (21mer)

본 과제에서 우리는 *ATPG4* 유전자가 식물 호르몬 cytokinin signaling에도 관여하는지를 밝히기 위하여 cytokinin signaling pathway 중 CLV1/WUS pathway에 관여하는 *CLV1* 유전자(receptor protein kinase CLAVATA1, AT1G75820)와 cytokinin receptor로서 기능을 가지는 histidine kinase 유전자군의 *HK2*(histidine kinase 2, AT5G35750), *HK3*(histidine kinase3, AT1G27320) 그리고 *CRE1*(*HK4*: histidine kinase 4, AT2G01830) 유전자의 발현을 조사하였다(그림 3). 적용된 유전자와 *ATPG4*, 그리고 양성대조구인 tubulin에 대한 RT-PCR용 primer 정보는 표 3과 같다. 그 결과 흥미롭게도 *CRE1* 유전자의 발현은 모두 대조구보다 발현이 증가하였으며, *ATPG4* 유전자 발현 정도와 비례하여 과발현 변이체에서 발현된 반면, *CLV1*, *HK2*, 그리고 *HK3* 유전자의 발현은 변이체에서 큰 변화가 없었다. 이러한 사실을 통하여 *ATPG4* 유전자가 cytokinin pathway 중 CLV1/WUS pathway에는 관여하지 않으며, cytokinin receptor중 *CRE1* 유전자의 발현에 비례적으로 관여한다는 것을 알 수 있다. 따라서 *ATPG4* 유전자 발현은 *CRE1* 유전자의 발현을 비례적으로 조절하고 이를 통하여 대조구보다는 발현이 높지만 상대적으로 *CRE1*의 낮은 발현은 다수성 형질을 제공하고 *CRE1*의 높은 발현은 녹기 연장의 형질을 제공한다는 가설을 세울 수 있었다.

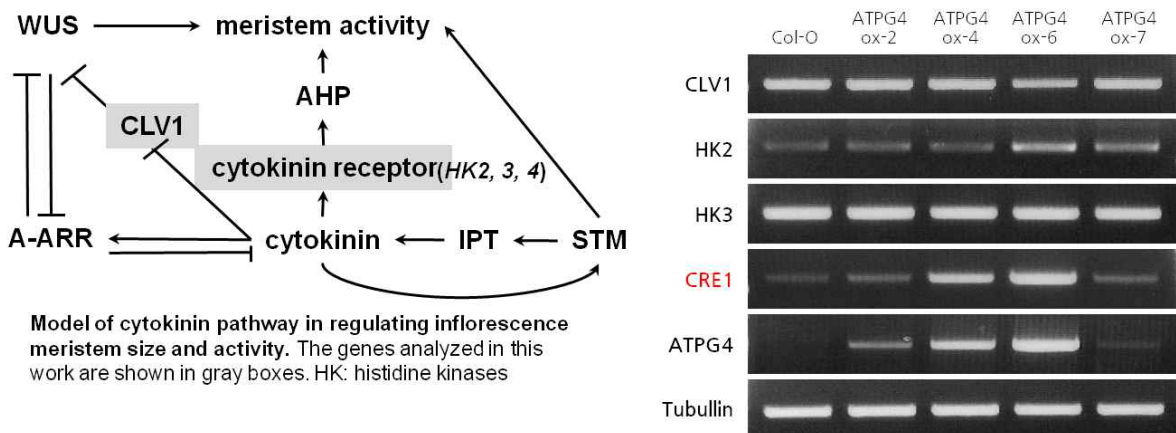


그림 3. *ATPG4* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 cytokinin signaling pathway에서 *CLV1* 유전자, histidine kinase (HK) 유전자군, 그리고 *ATPG4* 유전자에 대한 RT-PCR 결과. 양성 대조구는 tubulin.

우리는 cytokinin signaling의 다음 단계인 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군의 *AHP1*, *AHP2*, *AHP3*, *AHP4*, *AHP5*, 그리고 *AHP6* 유전자의 발현 또한 조사하였다. 상기 유전자의 발현 양상은 RT-PCR을 통하여 분석하였으며, 이때 양성 대조구로는 tubulin을 사용하였고, 사용된 프라이머는 표 4에서 제시하였다. 그 결과, 형질전환체의 *ATPG4* 유전자의 발현량과 비례적으로 발현한 유전자는 *AHP1*이었으며, 흥미롭게도 *AHP4*, *AHP5*, 그리고 *AHP6* 유전자는 *ATPG4*의 발현량이 상대적으로 높으면 대조구보다 낮은 발현량을 나타낸 반면 *ATPG4*의 발현량이 상대적으로 낮으면 대조구보다 높은 발현량을 나타내었다(그림 4). 이러한 사실은 *ATPG4* 유전자 발현은 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군 중 *AHP1* 유전자의 발현을 비례적으로 조절하고, *ATPG4* 유전자의 상대적으로 높은 발현은 *AHP4*, *AHP5*, 그리고 *AHP6* 유전자에 대한 negative regulator로 작용하는 반면 *ATPG4* 유전자의 상대적으로 낮은 발현은 *AHP4*, *AHP5*, 그리고 *AHP6* 유전자에 대한 positive regulator로 작용한다는 것을 시사한다.

표 4. Cytokinin signaling pathway에서 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군, *ATPG4*, 그리고 양성 대조구 tubulin 유전자에 대한 RT-PCR용 primer 정보

GENE	Primer Information
<i>AHP1</i> (AT3G21510)	AHP1-RT-F: 5'- ATGGATTGGTTCAGAAGCAGAA -3' AHP1-RT-R: 5'- TCAAAATCCGAGTTCGACGGCC -3'
<i>AHP2</i> (AT3G29350)	AHP2I-RT-F: 5'- ATGGACGCTCTCATTGCTCAGC -3' AHP2I-RT-R: 5'- TTA GTT AAT ATC CAC TTG AGG AAC -3'
<i>AHP3</i> (AT5G39340)	AHP3-RT-F: 5'- GGACACACTCATTGCTCAGT -3' AHP3-RT-R: 5'- CTGCAAACATCTCACACACC -3'
<i>AHP4</i> (AT3G16360)	AHP4I-RT-F: 5'- ATGCAGAGGCAAGTGGCACTCA -3' AHP4I-RT-R: 5'- TTAAGTGGGCTACGTGCTGTC -3'
<i>AHP5</i> (AT1G03430)	AHP5-RT-F: 5'- GGTAGTAGCTCCAGTGTCG -3' AHP5-RT-R: 5'- CTAATTTATATCCACTTGAGGAAT-3'
<i>AHP6</i> (AT1G80100)	AHP6-3UTR-F: 5'- CAAGCCGACATCAACCGGCTC -3' AHP6-3UTR-R: 5'- AGGGTTTCGCTTCGGTAGCTT -3'
<i>ATPG4</i>	E-AT4-F : 5'- CAC CAT GGC GAA TCC ATG GTG GAC AG -3' (26-mer) E-AT4-R : 5'- TTA AAA TCC TGA CCT AGC TTG AG -3' (23-mer)
Tubulin	TUB-F : 5'- CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA -3' (21mer) TUB-R : 5'- TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3' (21mer)

이러한 분석을 통하여 우리는 다음과 같은 가설을 세울 수 있었다. 1) *ATPG4*는 cytokinin biosynthesis 유전자 중 *IPT1*과 *IPT7* 유전자의 발현을 반비례적으로 조절, 2) *ATPG4*는 cytokinin receptor 유전자 중 *CRE1* 유전자의 발현을 비례적으로 조절, 2) *ATPG4*는 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군 중 *AHP1* 유전자 발현도 비례적으로 조절, 3) *ATPG4* 유전자의 상대적으로 높은 발현은 *AHP4*, *AHP5*, 그리고 *AHP6* 유전자에 대한 발현 억제를 유도하는 반면 *ATPG4* 유전자의 상대적으로 낮은 발현은 *AHP4*, *AHP5*, 그리고 *AHP6* 유전자에 대한 발현 증가를 유도, 4) 따라서 *ATPG4* 유전자의 발현 증가는 *CRE1*과 *AHP1*

유전자의 발현량 증가와 *AHP4*, *AHP5*, 그리고 *AHP6* 유전자의 발현량 감소를 유발하고, 이는 앞선 내용에서 보는 바와 같이 노화관련 유전자의 발현을 조절하여 노화 지연의 형질을 제공하는 반면, *ATPG4* 유전자의 상대적으로 낮은 발현 증가는 *CRE1*과 *AHP1* 유전자의 낮은 발현량 증가와 *AHP4*, *AHP5*, 그리고 *AHP6* 유전자의 발현량 증가를 유도하여 식물의 종자 수확량 증가, 바이오매스 증가와 같은 생산성 증대의 형질을 제공(그림 5). 이러한 가설을 통해 *AHP4*, *AHP5*, 그리고 *AHP6* 유전자는 negative regulator 기능을 가졌을 때 식물의 노화 지연과, positive regulator 기능을 가졌을 때 식물의 생산성 증대를 제공하는 중요한 지표로 사용될 수 있을 것이다.

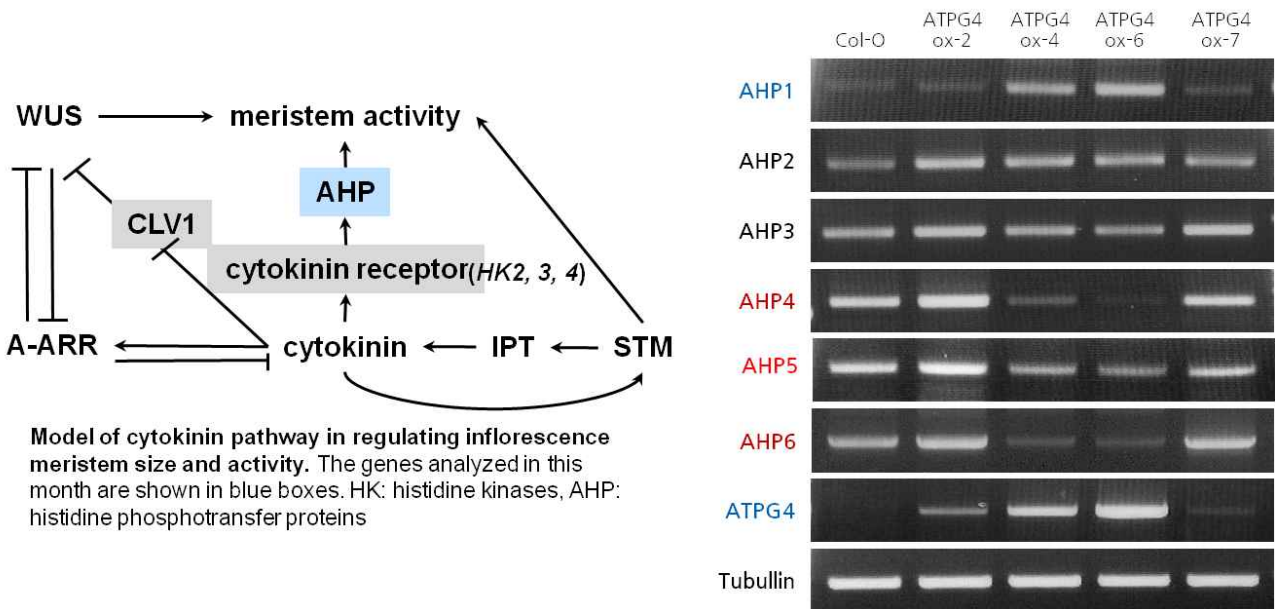


그림 4. *ATPG4* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 cytokinin signaling pathway에서 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군, 그리고 *ATPG4* 유전자에 대한 RT-PCR 결과. 양성 대조구는 tubulin.

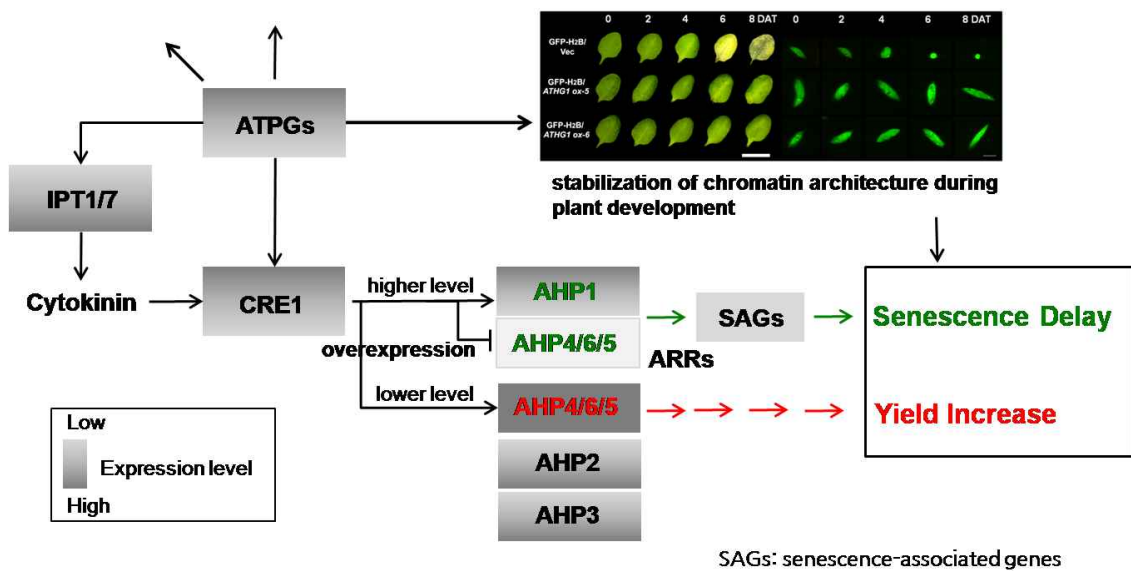
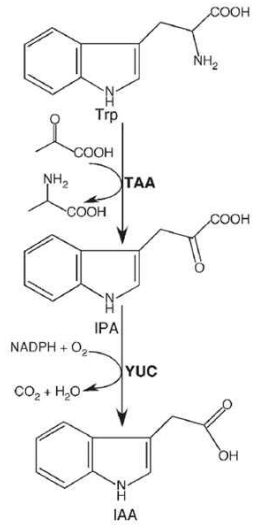


그림 5. Proposed model for the prominent role of *ATPG4* in the yield increase and/or senescence delay by the regulation of cytokinin signaling of *Arabidopsis*.

최근, Lee와 Seo(2017)는 애기장대에서 AT-hook motif를 가진 유전자인 *AHL29*는 *YUC* 유전자 발현 조절을 통해 auxin biosynthesis에 관여한다고 보고하고 있다. 본 연구팀은 *ATPG4*가 cytokinin signaling뿐만 아니라 auxin biosynthesis에도 관여하는지를 규명하기 위하여 애기장대의 auxin biosynthesis에서 중요한 역할을 담당하는 *YUC* 유전자 10종에 대한 유전자 발현 양상을 애기장대 야생형과 변이체 라인을 대상으로 조사하였다(그림 6). 적용된 유전자 및 *ATPG4*와 양성대조구인 tubulin에 대한 RT-PCR용 primer 정보는 표 5에서 제시하였다. 그 결과 흥미롭게도 *ATPG4* 유전자 과발현 정도가 상대적으로 높은 변이체 *ATPG4* α -4와 *ATPG4* α -6는 *YUC* 유전자군의 상대적으로 낮은 발현을 유도하였으며, *ATPG4* 유전자의 과발현 정도가 상대적으로 낮은 변이체 *ATPG4* α -2와 *ATPG4* α -7은 상대적으로 높은 *YUC* 유전자군의 발현을 유도하였다. 이러한 *ATPG4* 유전자 과발현에 대한 반비례적 *YUC* 유전자 발현은 특히 *YUC3*, *YUC4*, *YUC7*, *YUC8*, *YUC10*, 그리고 *YUC11*에서 보다 뚜렷하게 나타났다. 한편 *YUC1*의 발현은 애기장대 야생형과 변이체 모두에서 나타나지 않았다. 이러한 사실은 *ATPG4* 유전자가 *YUC* 유전자군의 발현 조절을 통하여 auxin biosynthesis에 관여한다는 것을 의미하며, *ATPG4* 유전자의 상대적으로 낮은 과발현이 다수성 등과 같은 생산성 증대를 유도한다는 점에서 *ATPG4* 유전자의 상대적으로 낮은 과발현에 의한 *YUC* 유전자의 상대적 발현 증가는 아마 생산성 증대에 있어 중요한 요인으로 작용할 수 있으리라 판단된다.

표 5. Auxin biosynthesis pathway에서 *YUC* 유전자군, *ATPG4*, 그리고 양성 대조구 tubulin 유전자에 대한 RT-PCR용 primer 정보

유전자명	정방향/역방향프라이머 (서열번호)
<i>YUC1</i> (AT4G32540)	YUC1-F: 5'-GTCCGACATAACGCATCTCC-3 YUC1-R: 5'-CAATCCTTCCCTCCTCTCC-3
<i>YUC2</i> (AT4G13260)	YUC2-F: 5'-CGTTCCAATTGCATAGCGTC-3 YUC2-R: 5'-CCACATCCTACAACCAAAATCTTC-3'
<i>YUC3</i> (AT1G04610)	YUC3-F: 5'-TCTCAAACCTCATCTACCTAAACAG-3' YUC3-R: 5'-CACATCCCACCACCAAAACC-3'
<i>YUC4</i> (AT5G11320)	YUC4-F: 5'-AACCTACTCAAATCTTCGTTCC-3' YUC4-R: 5'-CACAACCAACCACCAAAACC-3'
<i>YUC5</i> (AT5G43890z)	YUC5-F: 5'-GAGCAGATTGCATAGCTTCAC-3' YUC5-R: 5'-ACATCCGACGACAAGAACAC-3'
<i>YUC6</i> (AT5G25620)	YUC6-F: 5'-GTAAACTAGCACATGACCACC-3 YUC6-R: 5'-AAACTTATCCATCCCCTCAAAC-3
<i>YUC7</i> (AT2G33230)	YUC7-F: 5'-TGAAACGCCAAGAAGTTCC-3 YUC7-R: 5'-ACCACCAAAATCTTCTAAACCC-3'
<i>YUC8</i> (AT4G28720)	YUC8-F: 5'-GCAAACCATTTGCTAAGCC-3' YUC8-R: 5'-CCTGTCCTTCCCTTCCAACC-3'
<i>YUC10</i> (AT1G48910)	YUC10-F: 5'-ACCAACACTCAATCCCAAAC-3' YUC10-R: 5'-GCATAATCTCTCCCCAAAAG-3'
<i>YUC11</i> (AT1G21430)	YUC11-F: 5'-CCCTCAAACACTCCTACCTTC-3' YUC11-R: 5'-GTCTCCCTTCTATACGCTTAATC-3'
<i>ATPG4</i>	E-AT4-F : 5'- CAC CAT GGC GAA TCC ATG GTG GAC AG -3' (26-mer) E-AT4-R : 5'- TTA AAA TCC TGA CCT AGC TTG AG -3' (23-mer)
Tubulin	TUB-F : 5'- CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA -3' (21mer) TUB-R : 5'- TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3' (21mer)



The Tryptophan-Dependent Auxin Biosynthesis Pathway. The first step is catalyzed by TAAs that transfer the amino group from Trp to an alpha keto acid such as pyruvate to generate IPA and another amino acid. The second step is an oxygen and NADPH-dependent reaction catalyzed by the YUC flavin-containing monooxygenases. (Molecular Plant (2012) 5(2): 334-338)

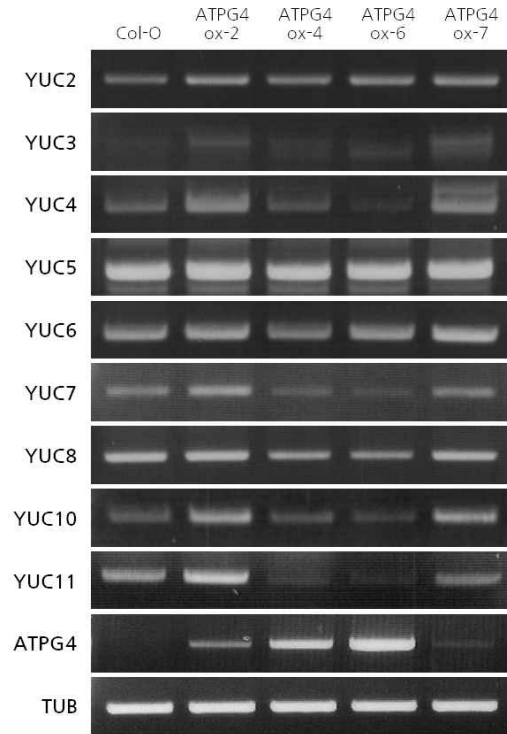


그림 6. *ATPG4* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 auxin biosynthesis pathway에서 *YUC* 유전자군, 그리고 *ATPG4* 유전자에 대한 RT-PCR 결과. 양성 대조구는 tubulin.

나. 신규 유용 유전자 발굴 및 기능 검정

Chromatin architecture 조절 기능을 가지는 AT-hook motif를 가진 유전자에 대한 homology approach를 통하여 신규 유전자 후보군을 콩과 식물의 기원식물인 *Medicago truncatula*와 애기장대에서 분리하고 direct approach를 수행하여 다수성 형질을 가지는 유용 유전자를 *M. truncatula*에서 2종, 그리고 애기장대에서 2종 발굴하고 그들의 기능 분석을 집중적으로 수행하였으며, 또한 본 연구팀은 기능성 유전체연구를 통하여 확보된 변이체의 정보를 이용하여 다수성 형질을 제공하는 유용 유전자를 애기장대에서 1종 발굴하여 그들의 기능 분석을 집중적으로 수행하였다. 또한 본 연구팀은 애기장대 AT-hook motif를 가진 유전자에 대한 homology approach를 통하여 콩에서 신규 유전자 후보군을 분리하여 이중 9종의 유전자에 대한 direct approach를 수행하고 있다.

1) *MtATPG1*(*Medicago truncatula* AT-hook protein of Genomine 1, MTR 4g098450): 다수성 형질

① 식물의 다수성 형질을 제공하는 *MtATPG1* 유전자 분리: *M. truncatula*의 AT-hook DNA-binding protein(GeneBank accession number NC_016410.1)의 염기서열을 기초로 하여 제한효소 *BglIII*의 서열이 포함된 정방향 primer(*BglIII*/MTR4g 098450-F, 5'-AGA TCT ATG CAA AAC ATC CAC AGG CAA AA-3')와 제한효소 *BstEII*의 서열이 포함된 역방향 primer(*BstEII*/MTR 4g098450-R, 5'-GGT GAC CTC AAA AAG GTT GAC GTG AAG CTG-3')를 합성하였다. 상기 primer를 사용하여 *M. truncatula* cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다. 상기 분리된 cDNA의 분석 결과, 약 29.5 kDa의 분자량을 갖는 285개의 아미노산을 암호화하는 858bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook motif를 가지고 있어 이를 *MtATPG1*으로 명명하였다.

② *MtATPG1* 발현 변이체의 표현형적 특징: 상기 유전자가 식물의 다수성 형질을 제공하는지를 확인하기 위하여 *MtATPG1* 유전자가 센스 방향으로 도입된 애기장대 형질전환체를 제조하여 *MtATPG1* 전사체의 발현을 변화시켰다. 사용된 벡터는 유도성 프로모터(inducible promoter)인 SEN1 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터이며, 유전자를 센스 방향으로 클로닝하여 *MtATPG1* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-MtATPG1 재조합 벡터를 제작하였다(그림 7). 상기 SEN1 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

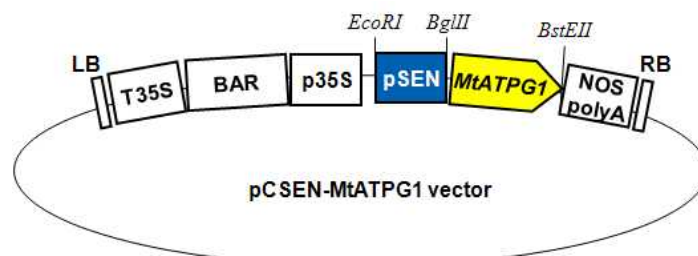


그림 7. *MtATPG1* 유전자의 발현을 위한 pCSEN-MtATPG1 vector의 모식도

상기 pCSEN-MtATPG1 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 일렉트로포레이션(electroporation) 방법을 이용하여 도입하고 애기장대에서 형질전환을 수행하였다. 이후, 형질전환된 애기장대를 계속 성장시켜 종자(T₁)를 수확하였다. 대조구로는 형질전환되지 않은 야생형(wild type) 애기장대 또는 *MtATPG1* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.

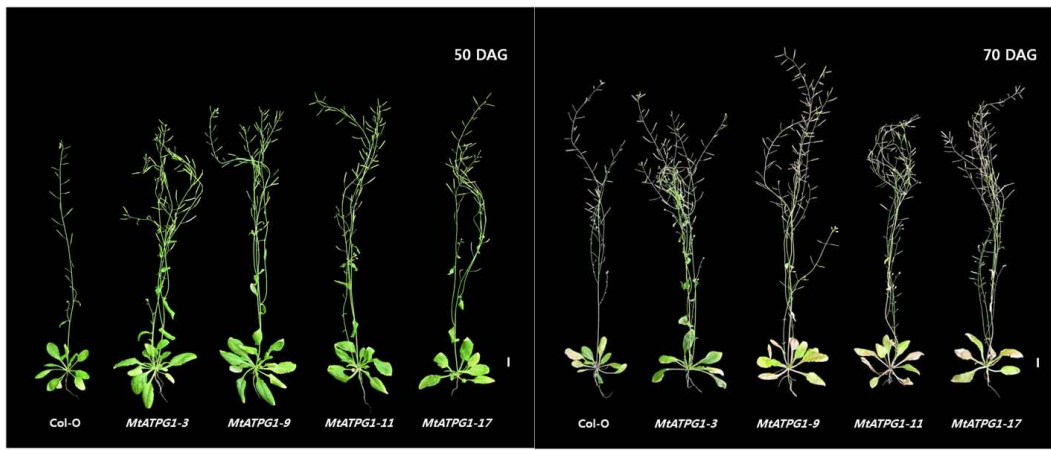


그림 8. *MtATPG1* 유전자 발현 애기장대 형질전환체의 발아 후 50일째, 그리고 70일째 표현형적 특징.

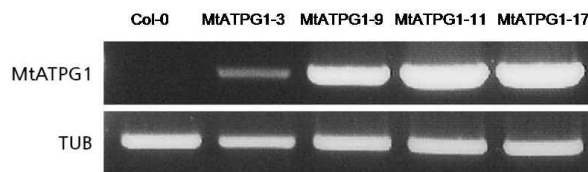


그림 9. *MtATPG1* 발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 RT-PCR을 통한 *MtATPG1*에 대한 유전자 발현 양상. 양성 대조구는 tubulin.

표 6. *MtATPG1*과 tubulin 유전자에 대한 RT-PCR용 primer 정보

GENE	Primer Information
<i>MtATPG1</i>	BglII/MTR4g 098450-F: 5'-AGA TCT ATG CAA AAC ATC CAC AGG CAA AA-3' (29-mer) BstEII/MTR 4g098450-R: 5'-GGT GAC CTC AAA AAG GTT GAC GTG AAG CTG-3' (30-mer)
Tubulin	TUB-F: 5'-CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA-3' (21mer) TUB-R: 5'-TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3' (21mer)

pCSEN-MtATPG1 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대는 대조구와 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 변이체들은 뚜렷한 다수성 형질 및 바이오매스 증대 형질을 보였다. 이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질전환 애기장대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째와 70일째 수행하였다(그림 8). pCSEN-MtATPG1 구성체를 가지고 있는 *MtATPG1-3*, *MtATPG1-9*, *MtATPG1-11*과 *MtATPG1-17* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Col-0)와 비교하여 볼 때, 식물체의 개체 크기

증가와 같은 바이오매스 증대와 장각과 수의 증가 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 아울러 이들 변이체들은 종자 생산량에서도 뚜렷한 증가 현상이 유발되었다. 이러한 표현형적 특징이 도입 유전자의 상대적 발현 정도에 기인하는지를 확인하기 위하여 우리는 자엽 형성 후 25일째의 대조구와 변이체 라인에 대한 유전자 발현 정도를 확인하였다(그림 9). *MtATPG1* 및 tubulin의 유전자 발현 분석을 위한 RT-PCR용 primer 정보는 표 6와 같다. 그 결과, 변이체 4라인 모두 애기장대 대조구에 비하여 *MtATPG1* 유전자의 발현이 나타남을 확인하였으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 *MtATPG1* 유전자가 도입된 변이체임을 증명하고 있다. 흥미롭게도, 변이체 4라인 모두 개체 크기와 장각과 생산량 증가와 같은 다수성의 표현형적 특징을 가지는 것으로 나타났다. 한편 본 변이체들은 애기장대의 AT-hook protein을 암호화하는 *ATPG* 유전자 그룹에서 나타나는 녹기 연장의 형질은 그리 강하게 나타나지 않았으나, 여전히 유전자의 발현 정도가 높은 변이체 *MtATPG1-11*과 *MtATPG1-17*에서는 녹기연장의 형질을 가지고 있음을 알 수 있었다. 이러한 녹기 연장에 대한 연구는 세대진전 후 호모 라인을 선별하여 이들을 재료로 하여 연구결과 (1)-⑤에서 제시하였다. 이러한 결과를 종합하여 보면, 우리가 제시한 유전자 발현조절을 통한 녹기연장과 생산성 증대에 대한 모델이 적합하다는 것을 확인할 수 있었다. 즉, *MtATPG1* 유전자의 도입은 다수성에 대한 표현형적 특징을 제공하며, 이들의 높은 발현량은 녹기 연장의 표현형적 특징을 제공한다는 것이다. 따라서 본 유전자의 적정 발현은 종자의 수확시기가 대조구와 비슷한 다수성 형질을 제공한다는 점에서 다수성 작물 개발에 보다 많은 장점을 제공하리라 확신한다.

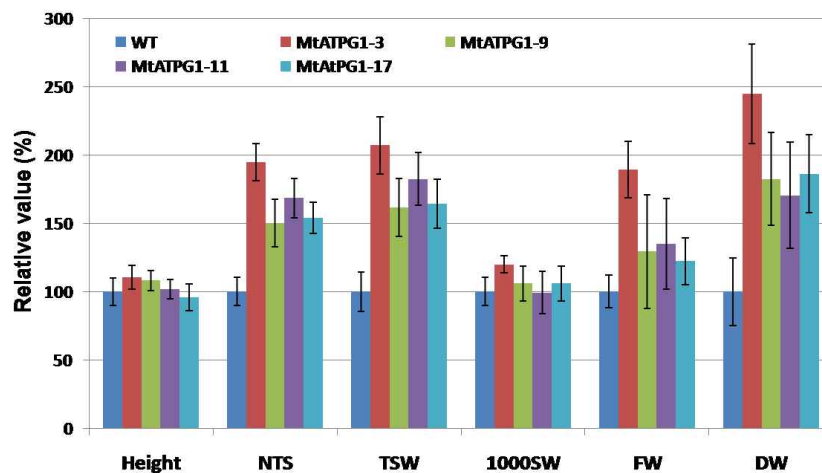


그림 10. *MtATPG1* 발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 생산성 증대 지표 분석 (n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; FW, fresh weight of plant; DW, weight of plant after dry; TSW, total seed weight; 1000SW, total number of seeds thousand seed weight.

③ *MtATPG1* 발현 변이체의 다수성 형질에 대한 특성 분석: 우리는 *MtATPG1* 유전자의 도입을 통하여 얻어진 식물체가 다수성에 대한 표현형질을 가짐을 위의 그림에서 확인하였다. 이러한 다수성 형질에 대한 보다 정확한 분석을 위하여 4종의 형질전환 라인을 대상으로 종자 수확량 등과 같은 생산성 지표를 조사하여 애기장대 대조구와 비교해 보았다(그림 10). 적용된 생산성 지표는 식물의 키(height), 장각과(silique) 수(NTS), 생체량(FW), 생체 건량(DW), 총 종자 무게(TSW), 그리고 1,000개의 종자 무게(1,000SW)이며, 결과는 라인별로 각 20개체의 평균 값이다.

MtATPG1 유전자 발현 변이체 라인, *MtATPG1-3*, *MtATPG1-9*, *MtATPG1-11*과 *MtATPG1-17* 모두는 애기장대 대조구에 비하여 1.5배 이상의 종자 생산이 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 *MtATPG1-3*은 대조구에 비하여 2배 이상의 종자 생산이 증가하였다. 이러한 종자 생산의 증가와 비례하여 모든 변이체 라인들은 장각과 수의 증가 패턴을 가졌다. 한편 종자 1,000개의 무게는 약간의 차이는 있으나 거의 대부분이 대조구와 비슷한 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어보아 *MtATPG1* 유전자의 발현은 종자 크기에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각되는 반면, 장각과 수의 증가를 유도하여 최종적으로 종자 생산량 증가를 이끄는 것으로 생각된다. 그리고 식물체의 크기에는 변이체와 대조구에 있어서 큰 차이가 없었으나 생체량과 생체 건강에 있어서는, 특히 생체 건강에 있어서는 변이체 모두는 대조구에 비하여 뚜렷한 증가 현상이 나타났다.

따라서 본 유전자의 콩 품종 개발에 대한 적용은 다수성 형질 및 바이오매스 증대와 같은 생산성 증대 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 판단되어, 현재 콩 형질전환용 벡터를 제작하여 형질전환체 생산하고, 이들에 대한 기능 분석을 수행하고 있다.

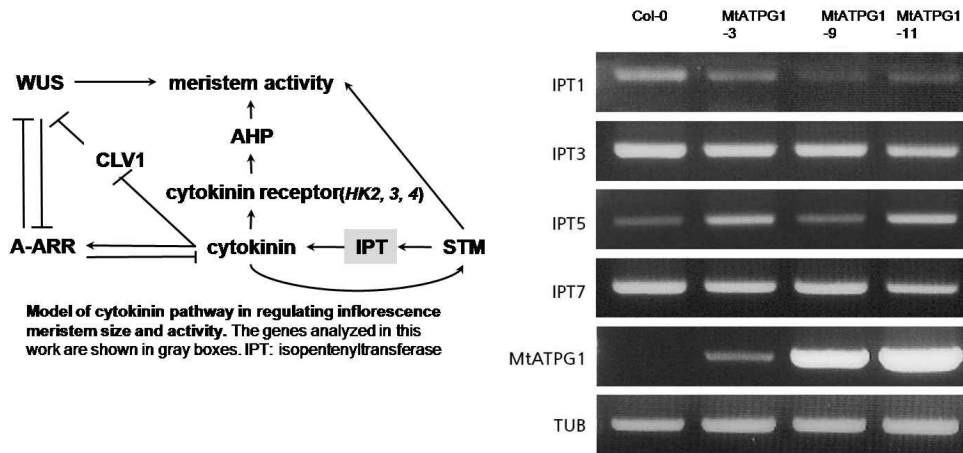


그림 11. *MtATPG1* 발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 cytokinin biosynthesis pathway에서 *IPT* 유전자군 및 *MtATPG1* 유전자에 대한 RT-PCR 결과. 양성 대조구는 tubulin.

표 7. Cytokinin 생합성에 관여하는 *IPT* 유전자군, *MtATPG1* 유전자, 그리고 양성 대조구인 *TUB* 유전자 발현을 위한 RT-PCR용 primer 정보

유전자명	정방향/역방향프라이머 (서열번호)
<i>IPT1</i>	5'-CGC TAC TCG TTT CCC TTC AG-3' 5'-TCG ACC CAG ATG AAA CAA CA-3'
<i>IPT3</i>	5'-CAA ACA ACC ATT GCC TCC TT-3' 5'-GGA CGG ATT CAA TGG AGA GA-3'
<i>IPT5</i>	5'-CAC TCC TGA GGA AAG CCT TG-3' 5'-TCG AGC TCT GGA ACT CCA AT-3'
<i>IPT7</i>	5'-TTG GGT CGA CGT TTC CTT AC-3' 5'-GAC GAT TCT CTC GCT TGG TC-3'
<i>MtATPG1</i>	5'-AGA TCT ATG CAA AAC ATC CAC AGG CAA AA-3' 5'-GGT GAC CTC AAA AAG GTT GAC GTG AAG CTG-3'
Tubulin	5'-CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA-3' 5'-TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3'

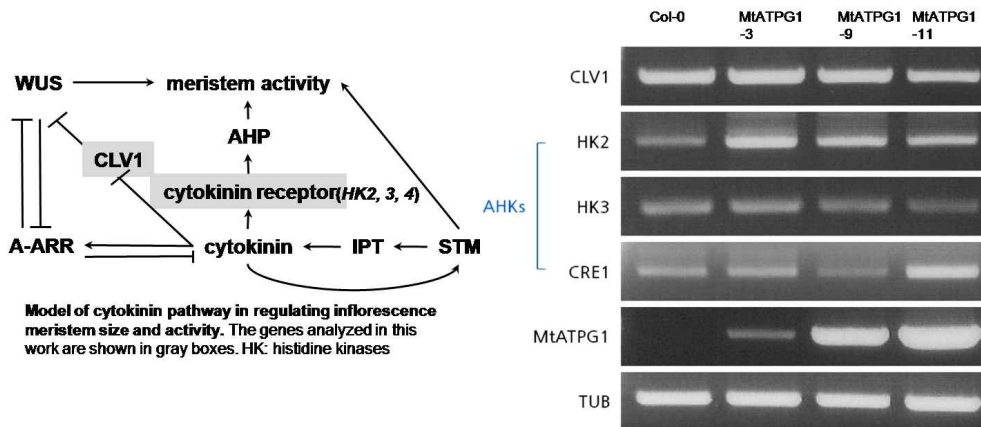


그림 12. *MtATPG1* 발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 cytokinin signaling pathway에서 *CLV1* 유전자, histidine kinase (HK) 유전자군, 그리고 *MtATPG1* 유전자에 대한 RT-PCR 결과. 양성 대조구는 tubulin.

④ Cytokinin signaling에 있어서 *MtATPG1* 유전자의 역할: *M. truncatula*에서 분리한 *MtATPG1* 유전자가 애기장대의 cytokinin 생합성에 관여하는지를 규명하기 위하여 애기장대 cytokinin 생합성 유전자 *IPT* (isopentenyltransferase) 유전자군의 *IPT1* (AT1G68460), *IPT3* (AT3G63110), *IPT5* (AT5G19040), 그리고 *IPT7* (AT3G23630) 유전자의 발현을 애기장대 야생형과 변이체 *MtATPG1-3*, *MtATPG1-9*, 그리고 *MtATPG1-11*을 대상으로 조사하였다(그림 11). 적용된 유전자 및 *MtATPG1*과 양성대조구인 tubulin에 대한 RT-PCR용 primer 정보는 표 7에서 제시하였다. 그 결과 *IPT* 유전자들의 발현, 특히 애기장대 잎에 많이 발현되는 *IPT3* 유전자의 발현은 대조구와 비교하여 약간의 차이는 있으나 변이체 모두에서 큰 차이를 가지지 않았다.

또한 우리는 *ATPG4*를 포함한 애기장대 AT-hook family gene이 cytokinin signaling에 관여하는지를 조사한 결과, 애기장대 AT-hook family gene은 cytokinin receptor인 HK(histidine kinase) gene family와 HP(histidine phosphotransfer protein) gene family의 발현을 조절하여 녹기연장 혹은/그리고 생산성 증대의 표현형적 특징을 제공한다는 가설을 세울 수 있었다. 본 연구에서 우리는 *M. truncatula*에서 분리한 *MtATPG1* 유전자 또한 애기장대의 cytokinin signaling에 관여하는지를 규명하기 위하여 cytokinin signaling pathway 중 *CLV1*/*WUS* pathway에 관여하는 *CLV1* 유전자(receptor protein kinase CLAVATA1, AT1G75820)와 cytokinin receptor로서 기능을 가지는 histidine kinase 유전자군의 *HK2*(histidine kinase 2, AT5G35750), *HK3*(histidine kinase3, AT1G27320) 그리고 *CRE1*(*HK4*: histidine kinase 4, AT2G01830) 유전자의 발현을 *MtATPG1-3*, *MtATPG1-9*, 그리고 *MtATPG1-11*을 대상으로 조사하였다(그림 12). 적용된 유전자 및 *MtATPG1*과 양성대조구인 tubulin에 대한 RT-PCR용 primer 정보는 표 3과 6에서 제시하였다. 그 결과 흥미롭게도 *CRE1* 유전자의 발현은 약간의 차이는 있지만 *MtATPG1* 유전자 발현 정도와 비례하여 변이체에서 발현된 반면, *HK2*와 *HK3* 유전자의 발현은 오히려 *MtATPG1* 유전자 발현 정도가 낮은 *MtATPG1-3* 변이체에서 높게 나타났다. 한편 *CLV1* 유전자의 발현은 대조구와 비교하여 변이체 모두에서 큰 차이를 가지지 않았다. 이러한 사실을 통하여 *MtATPG1* 유전자가 cytokinin pathway 중 *CLV1*/*WUS* pathway에는 크게 관여하지 않으며, cytokinin receptor중 *CRE1* 유전자의 발현에 비례적으로, 그리고 *HK2*와 *HK3* 유전자의 발현에는 반비례적으로 관여한다는 것을 알 수 있다. 따라서 *MtATPG1* 유전자 발현은 *CRE1* 유전자의 발현을 비례적으로 조절하고, *MtATPG1* 유전자의 낮은 발현량

은 *HK2*와 *HK3* 유전자의 높은 발현을 유도하여 다수성 형질을 제공하고 *MtATPG1* 유전자의 높은 발현량은 *CRE1*의 높은 발현량을 유도하여 다수성 형질과 더불어 일부 녹기 연장의 형질을 제공한다는 가설을 세울 수 있었다.

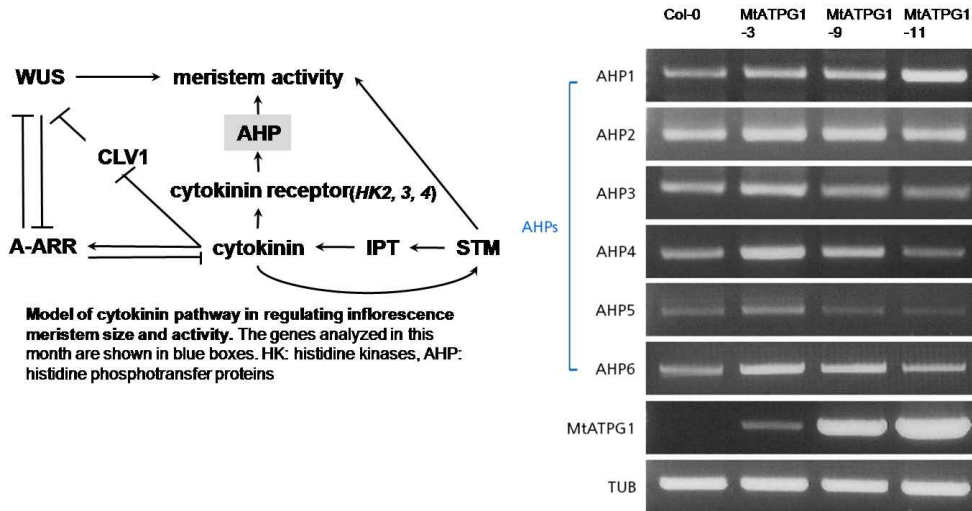


그림 13. *MtATPG1* 발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 cytokinin signaling pathway에서 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군, 그리고 *MtATPG1* 유전자에 대한 RT-PCR 결과. 양성 대조구는 tubulin.

우리는 cytokinin signaling의 다음 단계인 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군의 *AHP1*, *AHP2*, *AHP3*, *AHP4*, *AHP5*, 그리고 *AHP6* 유전자의 발현 양상 또한 조사하였다(그림 13). 상기 유전자의 발현 양상은 RT-PCR을 통하여 분석하였으며, 사용된 프라이머 정보는 표 4와 6에서 제시하였다. 그 결과, 형질전환체의 *MtATPG1* 유전자의 발현량과 비례적으로 발현한 유전자는 *AHP1*이었으며, 흥미롭게도 *AHP2~AHP6* 유전자는 *MtATPG1*의 발현량과 거의 반비례적으로 발현되었다. 즉 *MtATPG1*의 발현량이 상대적으로 높으면 *AHP2~AHP6* 유전자는 대조구와 유사하거나 낮은 발현량을 나타낸 반면 *MtATPG1*의 발현량이 상대적으로 낮으면 *AHP2~AHP6* 유전자는 상대적으로 대조구보다 높은 발현량을 나타내었다. 이러한 사실은 *MtATPG1* 유전자 발현은 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군 중 *AHP1* 유전자의 발현을 비례적으로 조절하고, *MtATPG1* 유전자의 상대적으로 높은 발현은 *AHP2~AHP6* 유전자에 대한 negative regulator로 작용하는 반면 *MtATPG1* 유전자의 상대적으로 낮은 발현은 *AHP2~AHP6* 유전자에 대한 positive regulator로 작용한다는 것을 시사한다.

이러한 분석을 통하여 우리는 다음과 같은 가설을 세울 수 있었다. 1) *MtATPG1*은 cytokinin pathway 중 cytokinin 생합성 및 CLV1/WUS pathway에는 크게 관여하지 않으며, 2) *MtATPG1*은 cytokinin receptor 유전자 중 *CRE1* 유전자의 발현을 비례적으로 조절, 3) *MtATPG1*은 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군 중 *AHP1* 유전자 발현도 비례적으로 조절, 4) *MtATPG1* 유전자의 상대적으로 높은 발현은 *AHP2~AHP6* 유전자에 대한 발현에 큰 영향을 미치지 않는 반면 *MtATPG1* 유전자의 상대적으로 낮은 발현은 *AHP2~AHP6* 유전자에 대한 발현 증가를 유도, 5) 따라서 *MtATPG1* 유전자의 상대적으로 낮은 발현 증가는 *AHP2~AHP6* 유전자의 발현량 증가를 유도하여 식물의 종자 수확량 증가, 바이오매스 증가와 같은 생산성 증대의 형질을 제공하는 반면, *MtATPG1* 유전자의 발현 증가는 *CRE1*과 *AHP1*

유전자의 발현량 증가를 유발하고, 이는 앞선 내용에서 보는 바와 같이 다수성 형질 제공과 더불어 노화관련 유전자의 발현을 조절하여 노화 지연의 형질을 제공함. 이러한 가설을 통해 *AHP1* 유전자가 positive regulator 기능을 가졌을 때 식물의 노화 지연 형질을, 그리고 *AHP2~AHP6* 유전자가 positive regulator 기능을 가졌을 때 식물의 생산성 증대를 제공하는 중요한 지표로 사용될 수 있을 것이다(그림 14). 이러한 *MtATPG1*의 cytokinin signaling에 대한 역할은 애기장대의 AT-hook 유전자의 역할과 유사한 것으로 나타났으며, 이러한 사실은 본 유전자 또한 콩에서도 유사한 기능을 가져 다수성 콩 품종 개발에 많은 장점을 제공하리라 생각된다.

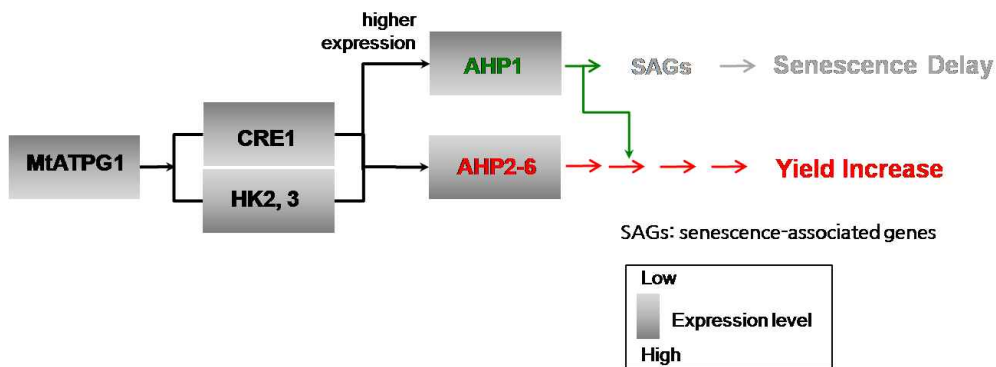


그림 14. Proposed model for the prominent role of *MtATPG1* in the yield increase and/or senescence delay by the regulation of cytokinin signaling of *Arabidopsis*.



그림 15. *MtATPG1* 발현 애기장대 형질전환 T_3 homo 라인의 발아 후 40일째 표현형적 특징. Bar indicates 1 cm.



그림 16. *MtATPG1* 발현 애기장대 형질전환 T₃ homo 라인의 발아 후 60일째 표현형적 특징. Bar indicates 1 cm.

⑤ *MtATPG1* 발현 변이체의 세대 진전을 통한 homo 라인 선별 및 기능 분석: 본 과제에서 우리는 변이체의 다수성 형질 및 녹기 연장에 대한 표현형질 안정성을 확인하기 위하여 확보된 변이체를 세대 진전시켜 homo 라인을 선별하고 그들의 표현형이 앞 세대의 표현형과 같은 지를 확인하였다. 그림 15와 16에서 보는 바와 같이 발아 후 40일째 및 60일째 형질전환체 T₃ 라인의 대부분은 앞선 결과와 마찬가지로 뚜렷한 다수성 형질 및 바이오매스 증대 형질을 나타내었다. 한편 형질전환 라인 중 *MtATPG1-11-2*와 *MtATPG1-11-7* 라인들의 경우, 생산성 증대 형질과 더불어 녹기 연장의 형질도 일부 나타남을 확인할 수 있었다. 이러한 녹기연장 형질은 앞서 언급한 바와 같이 *MtATPG1* 유전자의 높은 발현량에 기인하는 것으로 판단되며, 이러한 표현형적 특징은 앞 세대와 약간의 차이가 있는데 이러한 차이점은 hetero 라인으로부터 homo 라인이 선별되면서 표현형의 안정화에 따르는 것이라 생각된다.

표 8. *MtATPG1* 발현 애기장대 T₃ homo 라인의 생산성 증대 지표 분석 (n=20). (단위: relative value (%))

	WT	<i>MtATPG1-3-15</i>	<i>MtATPG1-3-20</i>	<i>MtATPG1-9-1</i>	<i>MtATPG1-9-18</i>	<i>MtATPG1-11-2</i>	<i>MtATPG1-11-7</i>
Height	100.00±5.81	106.96±6.21	107.42±7.35	105.91±9.29	106.84±6.32	110.43±7.85	111.41±8.58
NTS	100.00±16.57	129.77±18.35	108.00±12.08	153.25±14.09	121.52±12.56	155.96±19.55	173.39±12.84
TSW	100.00±13.86	163.36±22.97	169.44±15.72	143.03±18.16	128.53±13.51	148.22±29.90	160.86±20.58
1000SW	100.00±10.08	92.54±6.12	104.48±5.42	99.25±9.57	101.49±6.74	102.24±5.23	94.03±5.66
FW	100.00±20.71	172.59±28.55	122.35±20.41	153.59±21.61	164.09±21.72	164.38±24.27	180.07±24.99
DW	100.00±28.14	251.53±34.62	117.49±16.59	139.00±19.37	139.83±13.72	155.55±28.08	210.99±31.37

Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; FW, fresh weight of plant; DW, weight of plant after dry; TSW, total seed weight; 1000SW, total number of seeds thousand seed weight.

세대 진전된 homo 라인들의 생산성 증대에 대한 형질을 확인하기 위하여 본 연구팀은 생산성 지표를 분석하여 형질전환체의 농업형질을 조사하였다. *MtATPG1* 유전자 발현 변이체 라인 모두는 애기장대 대조구에 비하여 1.3배 이상의 종자 생산 증가가 나타났으며, 특히 *MtATPG1-3-15*와 *MtATPG1-3-20*은 애기장대 대조구에 비하여 1.6배 이상의 종자 생산 증가가 나타났다. 이러한 종자 생산의 증가와 비례하여 대부분의 변이체 라인들은 장각과 수의 증가 양상을 가졌으며, 종자 1,000개의 무게는 모든 변이체들이 대조구와 비슷하게 나타났다. 또한 생체량과 생체 건량에 있어서도 변이체 모두는 대조구에 비하여 뚜렷한 증가 현상이 나타났다 (표 8). 이러한 결과는 앞선 세대의 생산성 증대에 대한 결과와 같은 양상을 나타내었다. 이러한 사실로 미루어보아 *MtATPG1* 유전자의 발현이 세대진전에 있어서도 생산성 증대 형질에 대한 표현형적 형질의 안정화를 유지한다는 점에서 작물에 적용 시 생산성 증대 형질의 안정적인 세대진전이 이루어 질 수 있으리라 판단된다.

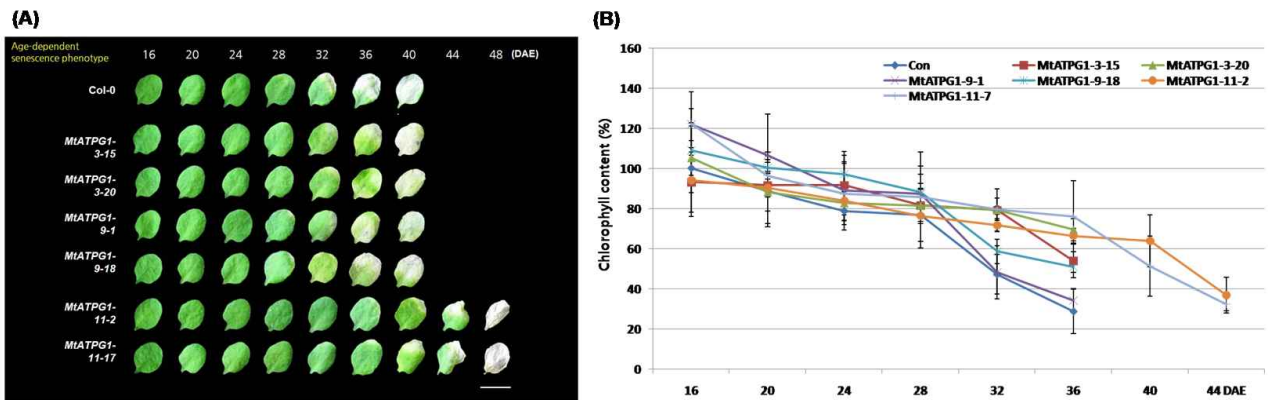


그림 17. *MtATPG1* 발현 애기장대 T_3 homo 라인의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징(A)과 엽록소 함량 변화 (n=3)(B)

한편 앞선 결과에서 보듯이 *MtATPG1* 발현 T_2 변이체들은 애기장대의 AT-hook protein을 암호화하는 유전자 그룹에서 나타나는 녹기 연장의 형질은 그리 강하게 나타나지 않았으나, 여전히 유전자의 발현 정도가 높은 변이체 *MtATPG1-11*과 *MtATPG1-17*에서는 녹기연장의 형질을 가지고 있음을 알 수 있었다. 본 유전자의 녹기 연장에 대한 형질을 정확히 분석하기 위하여 세대진전을 통해 확보된 T_3 homo 변이체 라인들을 대상으로 나이-의존적 노화 및 암-유도 노화에 대한 특성을 조사하였다. *MtATPG1* 발현 변이체의 나이-의존적 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, T_3 homo 세대에서 자엽 생성 후 16일 이후부터 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 48일까지 표현형 관찰과 잎 엽록소 함량을 측정하여 애기장대 대조구와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 대조구의 경우 32일 이후 잎의 황화 현상이 시작하여 40일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 한편 변이체 *MtATPG1-11-2*와 *MtATPG1-11-17*은 자엽 생성 후 36일째부터 잎의 황화 현상이 심화되어 44일 이후 잎의 괴사 현상이 일어남을 확인할 수 있었다. 나머지 변이체 라인 *MtATPG1-3-15*, *MtATPG1-3-20*, *MtATPG1-9-1*, 그리고 *MtATPG1-9-18*은 노화 진행 양상이 대조구의 그것과 유사하였다(그림 17A). 이러한 표현형적 특징을 보다 자세히 조사하기 위하여 나이-의존적 노화 동안 엽록소 함량을 측정하였다. 엽록소 함량은 663.2 nm와 664.8 nm의 흡광 계수를 이용하여 Lichtenthaler와 Wellburn의

방법(*Biochemical Society Transduction* 603:591~592, 1983)에 따라 측정하였다. 그 결과, 그림 17B에 도시된 바와 같이, 대조구와 변이체의 나이-의존적 노화 진행 동안 엽록소 함량 변화는 앞선 표현형 변화 양상과 유사하게 나타났다.

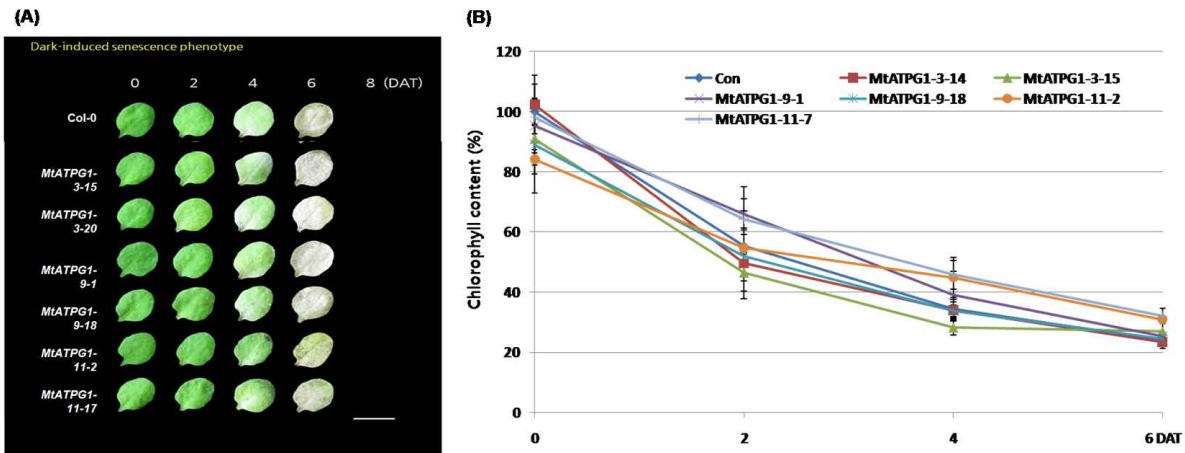


그림 18. *MtATPG1* 발현 애기장대 T₃ homo 라인의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징(A)과 엽록소 함량 변화(n=3)(B)

노화 촉진 요인으로 알려진 암 처리에 대한 *MtATPG1* 발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T₃ homo 세대에서 발아 후 21일째 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 detach하여 3 mM MES 완충용액(2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 8일까지 표현형 관찰과 잎 엽록소 함량을 측정하여 애기장대 대조구와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 대조구의 경우 암 처리 후 4일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 8일 이후 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었으며, *MtATPG1-11-2*와 *MtATPG1-11-17*를 제외한 나머지 변이체 라인들도야생종과 같이 암 처리 후 4일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되고 8일째 잎이 괴사 상태에 접어들 수 있었다(그림 18A). 이러한 표현형적 특징을 확인하기 위하여 암-유도 노화 동안 엽록소 함량을 조사한 결과 나이-의존적 노화와 마찬가지로 대조구와 비슷한 엽록소 함량 감소 패턴을 가졌다(그림 18B). 본 연구를 통해 규명된 *MtATPG1-11-2*와 *MtATPG1-11-17* 라인의 녹기 연장 형질은 본 유전자 *MtATPG1*의 높은 발현량에 기인하며, 이러한 사실로 미루어 보아 *MtATPG1* 유전자의 일반적인 발현은 식물의 노화에 있어서는 큰 효과가 없는 반면, 유전자 발현이 강력해지면 식물의 녹기 연장 형질을 일부 제공하는 것으로 판단된다.

한편, 우리는 *MtATPG1* 유전자가 스트레스에 대한 저항성을 제공하는 지를 확인하기 위하여, 산화 스트레스의 경우 3 mM MES 용액에 4 mM H₂O₂를 첨가하여 발아 후 25일된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 3일 간격으로 잎의 표현형적 변화와 엽록소 함량 변화를 조사하여 산화 스트레스에 대한 저항성 정도를 조사하였으며, salt 스트레스의 경우 동일한 조건에서 150 mM NaCl을 첨가하여 salt 스트레스에 대한 저항성을 조사하였다. 그 결과 본 변이체들은 산화 및 salt 스트레스에 대한 저항성을 크게 가지지 않음을 확인할 수 있었다(그림 19). 또한 변이체의 엽록소 함량 변화 양상도 표현형적 변화와 유사한 양상을 가졌다(data not shown). 이러한 사실은 *MtATPG1*이 식물의 산화 및 salt 스트레스에 대한 저항성을 거의 제공하지 않는다는 것을 의미한다.

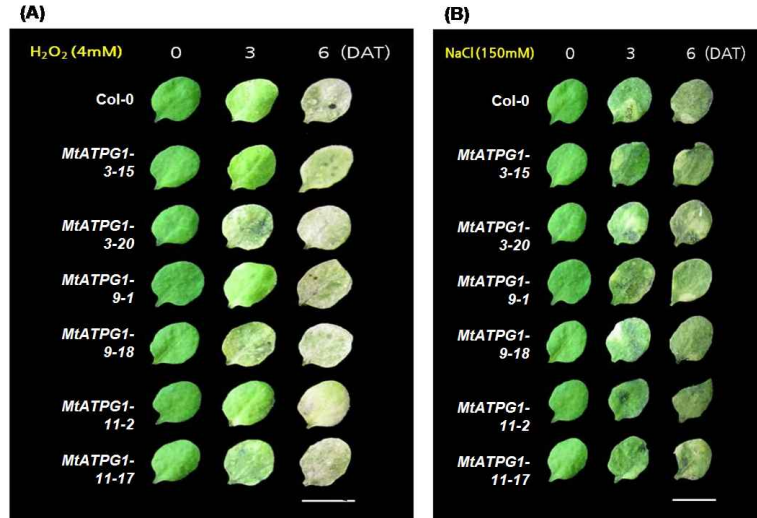


그림 19. *MtATPG1* 발현 형질전환 *T₃ homo* 라인의 산화(A) 및 염 스트레스(B)에 대한 표현형적 특징. Bar: 1 cm.

⑥ SUMMARY

- *M. truncatula*의 AT-hook DNA-binding protein(GeneBank accession number NC_016410.1)로 알려진 *MtATPG1*은 약 29.5 kDa의 분자량을 갖는 285개의 아미노산을 암호화하는 858bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음
- *MtATPG1* 유전자의 발현은 애기장대의 다수성, 바이오매스 증대와 같은 생산성 증대에 대한 농업형질을 제공하며, 또한 일부 녹기 연장의 형질을 제공.
- 이러한 표현형적 특징은 *MtATPG1* 유전자의 발현 정도에 따라 조절됨. 즉, *MtATPG1* 유전자의 발현이 정상적이거나 상대적으로 낮으면 생산성 증대의 표현형질을 제공, 그리고 유전자 발현이 상대적으로 높을수록 생산성 증대 형질과 더불어 녹기 연장의 표현형질을 제공.
- 이러한 표현형질의 차이는 *MtATPG1* 유전자의 cytokinin signaling 조절을 통해 유도. 즉 *MtATPG1* 유전자의 발현이 정상적이거나 상대적으로 낮으면 *AHP2*에서 *AHP6* 유전자의 발현량 증가를 유도하여 식물의 종자 수확량 증가, 바이오매스 증가와 같은 생산성 증대의 형질을 제공하는 반면, *MtATPG1* 유전자의 발현 증가는 *CRE1*과 *AHP1* 유전자의 발현량 증가를 유발하고, 이는 생산성 증대 형질 제공과 더불어 노화관련 유전자의 발현을 조절하여 노화 지연의 형질을 제공.
- *MtATPG1* 유전자는 애기장대의 염 및 산화 스트레스 저항성에 큰 영향을 미치지 않음.

2) *MtATPG2*(*Medicago truncatula* AT-hook protein of Genomine 2, MTR 8g098390): 다수성 형질

① 식물의 다수성 형질을 제공하는 *MtATPG2* 유전자 분리: *M. truncatula*의 AT-hook motif nuclear localized protein (GeneBank accession number NC_016414.1)의 염기서열을 기초로 하여 제한효소 *BglII*의 서열이 포함된 정방향 primer(*BglII*/MTR8g 098390-F, 5'-AGA TCT ATG GAT GGG AGA GAG GCT ATG G-3')와 제한효소 *BstEII*의 서열이 포함된 역방향

primer(BstEII/MTR8g 098390, 5'-GGT GAC CTC ATC CTC TTG TCA AGT CAA AGC-3')를 합성하였다. 상기 primer를 사용하여 *M. truncatula* cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다. 상기 분리된 cDNA의 분석 결과, 약 35.9 kDa의 분자량을 갖는 351개의 아미노산을 암호화하는 1,056 bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook motif를 가지고 있어 이를 *MtATPG2*로 명명하였다.

② *MtATPG2* 발현 변이체의 표현형적 특징: 상기 유전자가 식물의 다수성 형질을 제공하는지를 확인하기 위하여 *MtATPG2* 유전자가 센스 방향으로 도입된 애기장대 형질전환체를 제조하여 *MtATPG2* 전사체의 발현을 변화시켰다. 사용된 벡터는 유도성 프로모터(inducible promoter)인 SEN1 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터이며, 유전자를 센스 방향으로 클로닝하여 *MtATPG2* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-MtATPG2 재조합 벡터를 제작하였다(그림 20). 상기 SEN1 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

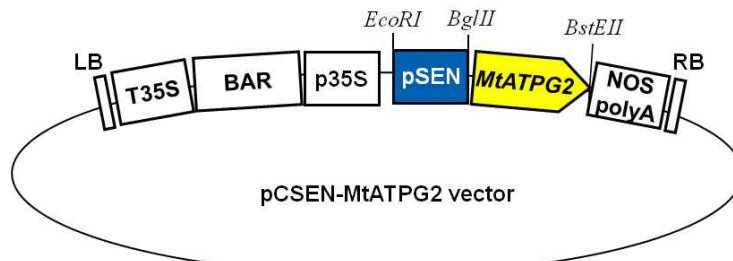


그림 20. *MtATPG2* 유전자의 발현을 위한 pCSEN-MtATPG2 vector의 모식도

상기 pCSEN-MtATPG2 재조합 벡터를 *Agrobacterium tumefaciens*에 electroporation 방법을 이용하여 도입하고 애기장대에서 형질전환을 수행하였다. 이후, 형질전환된 애기장대를 계속 성장시켜 종자(T₁)를 수확하였다. 대조구로는 형질전환되지 않은 야생형(wild type) 애기장대 또는 *MtATPG2* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.



그림 21. *MtATPG2* 유전자 발현 애기장대 형질전환체의 발아 후 50일째, 그리고 70일째 표현형적 특징.

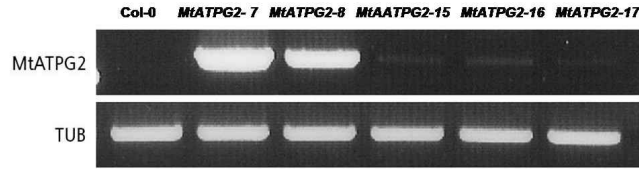


그림 22. *MtATPG2* 발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 RT-PCR을 통한 *MtATPG2*에 대한 유전자 발현 양상. 양성 대조구는 tubulin.

표 9. *MtATPG2*와 tubulin 유전자에 대한 RT-PCR용 primer 정보

GENE	Primer Information
<i>MtATPG2</i>	BglII/MTR8g 098390-F: 5'-AGA TCT ATG GAT GGG AGA GAG GCT ATG G-3' (28-mer) BstEII/MTR8g 098390: 5'-GGT GAC CTC ATC CTC TTG TCA AGT CAA AGC-3' (30-mer)
Tubulin	TUB-F: 5'-CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA-3' (21mer) TUB-R: 5'-TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3' (21mer)

pCSEN-MtATPG2 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대는 대조구와 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 변이체들은 뚜렷한 다수성 형질 및 바이오매스 증대 형질을 보였다. 이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 분석하기 위하여 T₁ 형질전환 애기장대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째와 70일째 수행하였다(그림 21). pCSEN-MtATPG2 구성체를 가지고 있는 *MtATPG2-7*, *MtATPG2-8*, *MtATPG2-15*, *MtATPG2-16*과 *MtATPG2-17* 변이체 라인 모두는 애기장대 대조구(Col-0)와 비교하여 볼 때, 식물체의 개체 크기 증가와 같은 바이오매스 증대와 장각과 수의 증가 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 아울러 이들 변이체들은 종자 생산량에서도 뚜렷한 증가 현상이 유발되었다. 이러한 종자 생산량 증가는 장각과 수의 증가에 기인하는 것으로 판단된다. 이러한 표현형적 특징이 도입 유전자의 발현에 의해 유도되는지를 확인하기 위하여 우리는 자엽 형성 후 25일째의 대조구와 변이체 라인에 대한 유전자 발현 정도를 확인하였다(그림 22). *MtATPG2* 및 tubulin의 유전자 발현 분석을 위한 RT-PCR용 primer 정보는 표 9와 같다. 그 결과, 변이체 5 라인 모두 애기장대 대조구에 비하여 *MtATPG2* 유전자의 도입으로 인한 정상적 발현이 나타남을 확인하였으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 *MtATPG2* 유전자가 도입된 변이체임을 증명하고 있다. 바이오매스 증대와 종자 생산량 증가는 형질전환 라인 마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 도입된 유전자 *MtATPG2* 유전자의 상대적 발현량 차이에 기인하는 것으로 나타났다. 한편 본 변이체들은 *MtATPG1* 변이체와 마찬가지로 애기장대의 AT-hook protein을 암호화하는 *ATPG* 유전자 그룹에서 나타나는 녹기 연장의 형질은 그리 강하게 나타나지 않았다. 이러한 녹기 연장에 대한 연구는 아래 연구결과 (2)-⑤에서 제시하였다.

③ *MtTPG2* 발현 변이체의 다수성 형질에 대한 특성 분석: 우리는 *MtATPG2* 유전자의 도입을 통하여 얻어진 식물체가 다수성에 대한 표현형질을 가짐을 위의 그림에서 확인하였다. 이러한 다수성에 대한 표현형적 특징은 앞서 언급한 *MtATPG1* 보다 훨씬 강하게 나타났다. 이러한 다수성 형질에 대한 표현형적 특징을 보다 정확히 분석하기 위하여 4종의 형질전환 라인을 대상으로 종자 수확량 등과 같은 생산성 지표를 조사하여 애기장대 대조구와 비교해 보았다(그림 23). 적용된 생산성 지표는 식물의 키(height), 장각과(silique) 수(NTS), 생체량(FW), 생체 건량

(DW), 총 종자 무게(TSW), 그리고 1,000개의 종자 무게(1,000SW)이며, 결과는 라인별로 각 20 개체의 평균값이다.

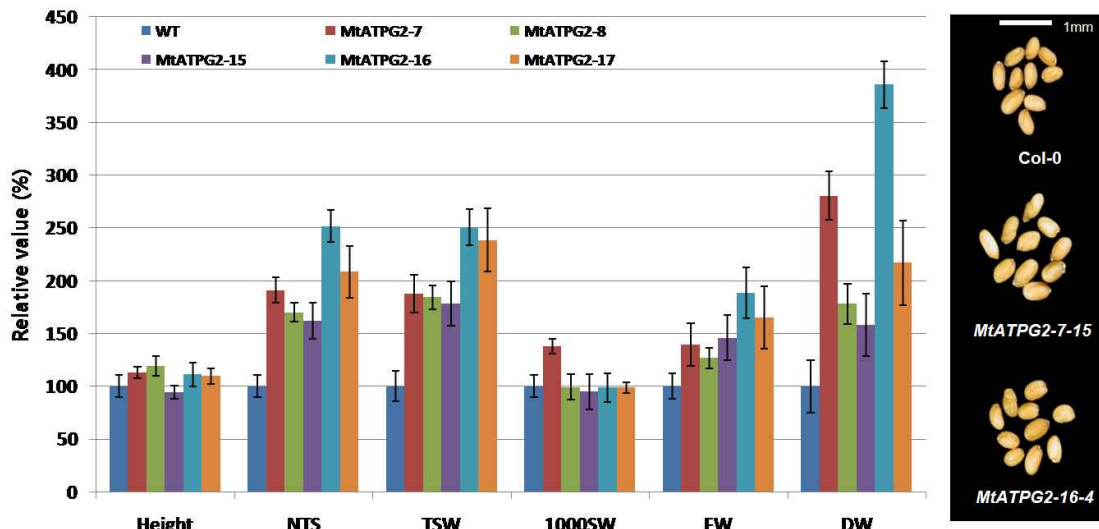


그림 23. *MtATPG2* 발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 생산성 증대 지표 분석(왼쪽, n=20)과 종자 크기 비교(오른쪽). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; FW, fresh weight of plant; DW, weight of plant after dry; TSW, total seed weight; 1000SW, total number of seeds thousand seed weight.

놀랍게도 *MtATPG2* 유전자 발현 변이체 라인, *MtATPG2-7*, *MtATPG2-8*, *MtATPG2-15*, *MtATPG2-16*과 *MtATPG2-17* 모두는 애기장대 대조구에 비하여 1.5배 이상의 종자 생산이 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 *MtATPG2-16*과 *MtATPG2-17*은 대조구에 비하여 2배 이상의 종자 생산이 증가하였다. 이러한 종자 생산의 증가와 비례하여 모든 변이체 라인들은 장각과 수의 증가 패턴을 가졌다. 한편 종자 1,000개의 무게는 거의 대부분이 대조구와 비슷한 것으로 나타났으나, *MtATPG2-7*는 대조구에 비하여 약 1.4배 이상의 무게를 나타내었다. 본 연구팀은 이러한 종자 1,000개의 무게에 대한 세부 연구로 종자 크기를 해부현미경으로 관찰하였다. 그 결과 *MtATPG2-7*는 애기장대 대조구 및 다른 형질전환 라인에 비하여 종자 크기가 증가하였음을 확인하였다. *MtATPG2-7* 변이체의 종자 크기 증가에 대한 부분은 추후 계속 연구를 진행할 예정이다. 전체적으로 보면 *MtATPG2* 유전자의 발현은 종자 크기에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각되는 반면, 장각과 수의 증가를 유도하여 최종적으로 종자 생산량 증가를 이끄는 것으로 생각된다. 그리고 식물체의 크기에는 변이체와 대조구에 있어서 큰 차이가 없었으나 생체량과 생체 건량에 있어서는, 특히 생체 건량에 있어서는 변이체 모두는 대조구에 비하여 뚜렷한 증가 현상이 나타났다. 앞서 발굴된 *MtATPG1* 유전자에 비하여 *MtATPG2* 유전자는 다수성 형질 제공에 있어서 보다 강력한 것으로 생각된다.

따라서 본 유전자의 콩 품종 개발에 대한 적용은 다수성 형질 및 바이오매스 증대와 같은 생산성 증대 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 판단되어, 콩 형질전환용 벡터를 제작하여 형질전환체 생산을 수행하고 있다.

④ Cytokinin signaling에 있어서 *MtATPG2* 유전자의 역할: *M. truncatula*에서 분리한 *MtATPG1*과 마찬가지로 *MtATPG2*도 애기장대의 cytokinin signaling을 조절하여 생산성 증대

혹은/그리고 노화지연의 표현형적 특징을 제공하는 지를 확인하기 위하여 cytokinin signaling pathway 중 CLV1/WUS pathway에 관여하는 *CLV1* 유전자(receptor protein kinase CLAVATA1, AT1G75820)와 cytokinin receptor로서 기능을 가지는 histidine kinase 유전자군의 *HK2*(histidine kinase 2, AT5G35750), *HK3*(histidin kinase3, AT1G27320) 그리고 *CRE1*(*HK4*: histidine kinase 4, AT2G01830) 유전자의 발현을 *MtATPG2-7*, *MtATPG2-8*, 그리고 *MtATPG2-15*를 대상으로 조사하였다(그림 24). 적용된 유전자 및 *MtATPG2*와 양성대조구인 tubulin에 대한 RT-PCR용 primer 정보는 표 3, 4, 그리고 9에서 제시하였다.

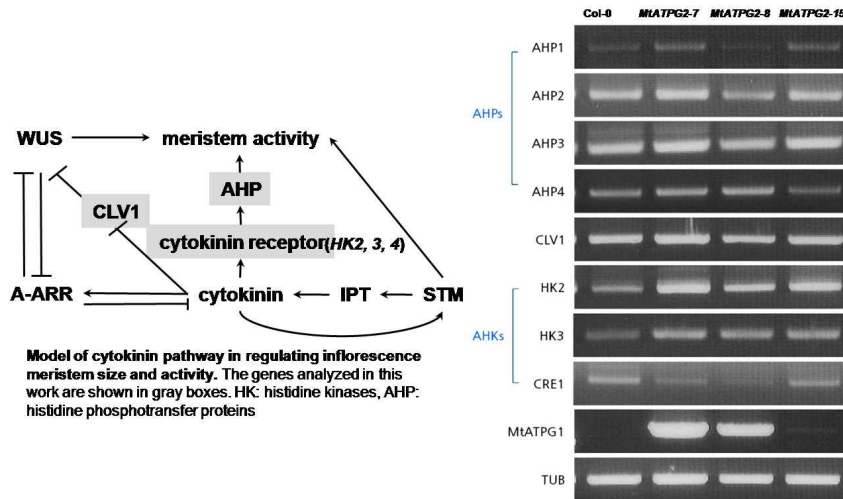


그림 24. *MtATPG2* 발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 cytokinin signaling pathway에서 histidine kinase (HK) 유전자군, histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군, 그리고 *MtATPG2* 유전자에 대한 RT-PCR 결과. 양성 대조구는 tubulin.

그 결과 HK 유전자군에서 *HK2*와 *HK3* 유전자의 발현은 변이체에서 모두 대조구에 비하여 증가하였으며, *CRE1* 유전자의 발현은 대조구에 비하여 변이체에서 비슷한 수준을 유지하거나 감소하는 현상을 나타내었다. 한편 *CLV1* 유전자의 발현은 대조구와 비교하여 변이체 모두에서 큰 차이를 가지지 않았다. Cytokinin signaling의 다음 단계인 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군의 *AHP1*, *AHP2*, *AHP3*, 그리고 *AHP4* 유전자의 발현 양상을 조사한 결과, *AHP1*, *AHP2*, 그리고 *AHP3*의 경우 대조구에 비하여 *MtATPG2-7*과 *MtATPG2-15* 변이체에서 높은 발현을 나타내었으며, *AHP4*의 경우 대조구에 비하여 *MtATPG2-7*과 *MtATPG2-8* 변이체에서 높은 발현을 나타내었다. 이러한 cytokinin signaling관련 유전자의 발현 양상은 앞서 제시된 *MtATPG1*의 그것과는 확연한 차이를 가졌다. 이러한 사실은 cytokinin signaling에 있어서 본 유전자의 역할이 *MtATPG1*의 역할과는 다르다는 것을 의미한다. 이러한 사실을 보다 명확히 확인하기 위하여 우리는 본 연구를 반복적으로 보다 세밀히 수행하고 있다.

⑤ *MtATPG2* 발현 변이체의 세대 진전을 통한 homo 라인 선별 및 기능 분석: 본 과제에서 우리는 변이체의 다수성 형질 및 녹기 연장에 대한 표현형질 안정성을 확인하기 위하여 확보된 변이체를 세대 진전시켜 hmo 라인을 선별한 후 그들의 표현형이 앞 세대의 표현형과 같은 지를 6종의 변이체를 재료로 하여 확인하였다. 그림 25에서 보는 바와 같이 발아 후 70일째 형질 전환체 T₃ 혹은 T₄ 라인의 대부분은 앞선 결과와 마찬가지로 뚜렷한 다수성 형질 및 바이오매스 증대 형질을 나타내었다. 그리고 형질전환 라인 중 *MtATPG2-7-15-11*과 *MtATPG2-7-15-12*

라인들의 경우, 생산성 증대 형질뿐만 아니라 일부 녹기 연장의 형질을 나타내었다. 형질전환체의 유전자 발현 조사를 통하여 이러한 다수성과 더불어 나타나는 녹기 연장의 형질은 본 유전자의 발현량 증가에 기인하는 것으로 나타났다(그림 26). 형질전환체의 이러한 표현형적 특징은 앞 세대와 약간의 차이가 있을 수 있는데 이러한 차이점은 hetero 라인으로부터 homo 라인이 선별되면서 유전자 발현의 변화에 기인하는 것으로 판단된다.



그림 25. *MtATPG2* 발현 애기장대 형질전환 T₃ 혹은 T₄ homo 라인의 발아 후 70일째 표현형적 특징. Bar indicates 1 cm.

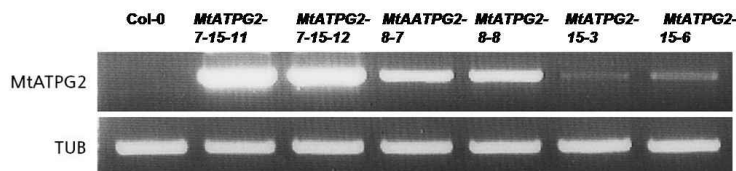


그림 26. *MtATPG2* 발현 애기장대 형질전환 T₃ 혹은 T₄ homo 라인의 RT-PCR을 통한 *MtATPG2*에 대한 유전자 발현 양상. 양성 대조구는 tubulin.

표 10. *MtATPG2* 발현 애기장대 형질전환 T₃ 혹은 T₄ homo 라인의 생산성 증대 지표 분석 (n=20).

(단위: relative value (%))

	WT	<i>MtATPG2</i> -7-15-11	<i>MtATPG2</i> -7-15-12	<i>MtATPG2</i> -8-7	<i>MtATPG2</i> -8-8	<i>MtATPG2</i> -15-3	<i>MtATPG2</i> -15-6
Height	100.00±8.58	121.29±13.52	113.04±13.64	117.93±5.94	120.27±5.65	96.36±8.92	102.64±5.08
NTS	100.00±11.61	150.74±18.23	124.77±9.55	152.29±12.02	159.13±12.07	156.27±15.47	174.84±11.78
TSW	100.00±17.17	141.57±20.71	124.69±17.61	134.68±14.07	160.62±14.01	156.47±18.68	192.76±17.72
1000SW	100.00±2.77	128.57±2.63	159.82±15.31	121.43±15.03	126.79±12.06	96.43±8.96	100.89±10.40
FW	100.00±15.08	114.99±22.20	124.80±26.75	99.67±15.70	106.92±21.20	110.53±16.49	139.52±17.00
DW	100.00±27.52	133.03±29.91	179.70±31.50	206.42±27.88	185.49±32.29	148.63±27.12	216.26±32.96

세대 진전된 homo 라인들의 생산성 증대에 대한 형질이 재현성을 가지는 지를 확인하기 위하여 본 연구팀은 생산성 지표를 분석하여 형질전환체의 농업형질을 조사하였다. *MtATPG2* 유전자 발현 변이체 라인 모두는 애기장대 대조구에 비하여 1.2배 이상의 종자 생산 증가가 나타났으며, 특히 *MtATPG2-8-8*, *MtATPG2-15-3*과 *MtATPG2-15-6*은 애기장대 대조구에 비하여 1.5배 이상의 종자 생산 증가가 나타났다. 흥미로운 점은 유전자 발현 정도가 따라 종자 생산의 차이를 나타내었다. 즉 유전자 발현 정도가 낮은 *MtATPG2-15* 라인들의 평균 종자 생산량이 가장 높은 반면, 유전자 발현 정도가 높은 *MtATPG2-7* 라인들의 평균 종자 생산량이 대조구보다 낮았으나 변이체 라인들에선 낮은 것으로 나타났다. 따라서 본 유전자의 발현 조절은 보다 높은 종자 생산성을 제공할 수 있으리라 판단된다. 이러한 종자 생산의 증가와 비례하여 대부분의 변이체 라인들은 장각과 수의 증가 양상을 가졌다. 흥미로운 점은 종자 1,000개의 무게는 대부분의 변이체들이 대조구와 비슷하게 나타났으나, *MtATPG2-7* 라인은 애기장대 대조구 및 다른 형질전환 라인에 비하여 종자 크기가 현저히 증가하였음을 확인하였다. 이러한 사실은 앞 세대의 결과와 일치하며 *MtATPG2-7* 변이체 라인의 종자 크기 증가에 대한 부분은 추후 계속 연구를 진행할 예정이다. 또한 생체량과 생체 건량에 있어서도 변이체 모두는 대조구에 비하여 뚜렷한 증가 현상이 나타났다(표 10). 이러한 결과는 앞선 세대의 생산성 증대에 대한 결과와 같은 양상을 나타내었다. 이러한 사실로 미루어보아 *MtATPG2* 유전자의 발현이 세대진전에 있어서도 생산성 증대 형질에 대한 표현형적 형질의 안정화를 유지한다는 점에서 작물에 적용 시 생산성 증대 형질의 안정적인 세대진전에 대한 많은 장점을 제공하리라 판단된다.

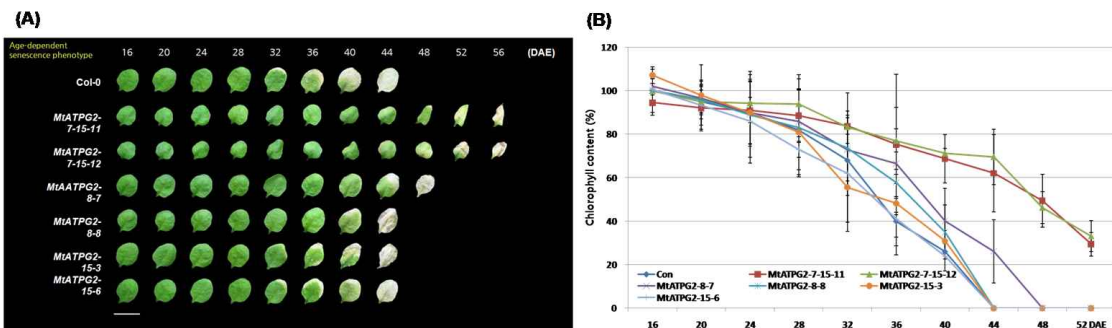


그림 27. *MtATPG2* 발현 형질전환 T_3 혹은 T_4 라인의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징(A)과 엽록소 함량 변화 (n=3)(B). Bar indicates 1 cm.

세대 진전된 호모 라인들의 녹기 연장에 대한 형질을 확인하기 위하여 나이-의존적 노화에 대한 특성을 조사하였다. 실험은 T_3 혹은 T_4 세대에서 자엽 생성 후 16일 이후부터 3-4번 좌엽 (rosette leaf)을 매 4일마다 56일까지 표현형 관찰과 잎 엽록소 함량을 측정하여 애기장대 대조구와 비교 조사하였다. 그 결과, 애기장대 대조구의 경우 32일 이후 잎의 황화 현상이 시작하여 40일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. *MtATPG2-8*과 *MtATPG2-15* 변이체 라인들은 야생종의 나이-의존적 노화 현상과 비슷하게 나타났으나 *MtATPG2-7* 변이체 라인들은 대조구에 비하여 노화 지연의 형질을 가지는 것으로 나타났다(그림 27A). 이러한 표현형적 특징을 보다 자세히 조사하기 위하여 나이-의존적 노화 동안 엽록소 함량을 측정하였다. 엽록소 함량은 Lichtenthaler와 Wellburn의 방법(1983)에 따라 측정하였다. 그 결과, 변이체의 표현형적 특

징과 마찬가지로 *MtATPG2-8*과 *MtATPG2-15* 변이체 라인들은 야생종의 엽록소 함량 변화와 비슷한 경향을 나타냈으나 *MtATPG2-7* 변이체 라인들은 대조구에 비하여 엽록소 분해가 현저히 지연되는 것으로 나타났다(그림 27B). 이러한 결과는 앞선 세대의 녹기 연장에 대한 표현형적 특징과 비슷하였다.

녹기 연장 형질 분석에 대한 두 번째 연구로 암-유도 노화에 대한 특성을 조사하였다. 노화 촉진 요인으로 알려진 암 처리에 대한 *MtATPG2* 발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 발아 후 21일째 형질전환 라인의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 detach하여 3 mM MES 완충용액(pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 6일까지 표현형 관찰과 잎 엽록소 함량을 측정하여 애기장대 대조구와 비교하였다. 그 결과, 애기장대 대조구의 경우 암 처리 후 4일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 6일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. *MtATPG2-8*과 *MtATPG2-15* 변이체 라인들은 대조구의 암-유도 노화 현상과 비슷하게 나타났으나 *MtATPG2-7* 변이체 라인들은 6일째에도 어느 정도 녹기를 유지하여 노화 지연의 형질을 가지는 것으로 나타났다(그림 28A). 이러한 표현형적 특징을 확인하기 위하여 암-유도 노화 동안 엽록소 함량을 조사한 결과 표현형적 특징과 비례적으로 엽록소 함량 감소 패턴을 가졌다(그림 28B). 이러한 사실로 미루어보아 *MtATPG2* 유전자의 발현이 세대진전에 있어서도 녹기 연장 및 다수성 형질에 대한 표현형적 형질의 안정화를 유지한다는 점에서 작물에 적용 시 농업 형질의 안정적인 세대진전이 이루어 질 수 있으리라 판단된다.

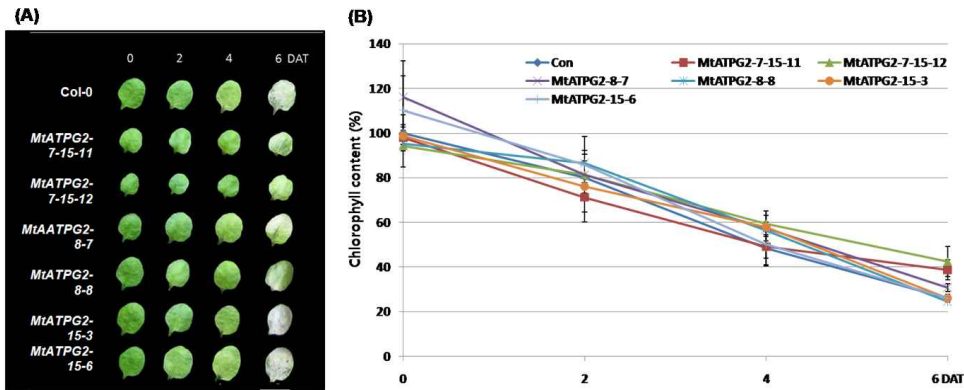


그림 28. *MtATPG2* 발현 형질전환 T₃ 혹은 T₄ 라인의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징(A)과 엽록소 함량 변화(n=3)(B). Bar indicates 1 cm.

MtATPG2 발현 변이체의 외부 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 우리는 산화 스트레스 및 염 스트레스에 대한 반응을 조사하였다. 산화 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3 mM MES 용액에 4 mM H₂O₂를 첨가하여 발아 후 25일된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 3일 간격으로 잎의 표현형적 변화와 엽록소 함량 변화를 조사하여 산화 스트레스에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 애기장대 대조구에 비하여 *MtATPG2-7* 라인들은 H₂O₂ 처리에 대한 잎의 황화 현상 지연과(그림 29A), 또한 엽록소 함량 감소가 지연됨을 확인할 수 있었다(data not shown). 한편 150 mM NaCl 처리를 통한 salt stress에 대한 저항성을 조사한 결과, 변이체들은 애기장대 대조구에 비하여 잎의 황화 현상 지연이 거의 나타나지 않았으며(그림 29B), 엽록소 함량 감소의 지연 현상도 거의 나타나지 않았다(data not shown). 이러한 사실은 *MtATPG2*의 높은 발현은 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공하는 반면 염 스

트레스에 대한 저항성은 유전자 발현량과 관계없이 거의 제공하지 않는다는 것을 의미한다. 따라서 *MtATPG2* 유전자의 이러한 산화적 스트레스에 대한 저항성은 기존의 유전자 특성인 식물의 생산성 증대 형질과 더불어 생산성 증대 작물 개발에 있어 많은 장점을 제공할 것으로 생각된다.

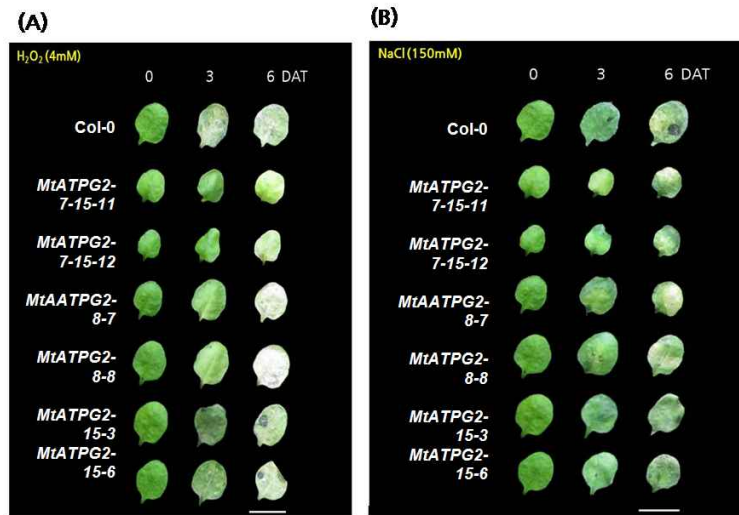


그림 29. *MtATPG2* 발현 형질전환 T₃ 혹은 T₄ 라인의 산화(A) 및 염 스트레스(B)에 대한 표현형적 특징. Bar: 1 cm.

⑥ SUMMARY

- *M. truncatula*의 AT-hook DNA-binding protein(GeneBank accession number NC_016414.1)로 알려진 *MtATPG2*는 약 35.9 kDa의 분자량을 갖는 351개의 아미노산을 암호화하는 1,056bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음
- *MtATPG2* 유전자의 발현은 애기장대의 다수성, 바이오매스 증대와 같은 생산성 증대에 대한 농업형질을 제공하며, 또한 일부 녹기 연장의 형질을 제공.
- 이러한 표현형적 특징은 *MtATPG2* 유전자의 발현 정도에 따라 조절됨. 즉, *MtATPG2* 유전자의 발현이 정상적이거나 상대적으로 낮으면 생산성 증대의 표현형질을 제공, 그리고 유전자 발현이 상대적으로 높을수록 생산성 증대 형질과 더불어 녹기 연장의 표현형질을 제공.
- 이러한 표현형질의 차이는 *MtATPG2* 유전자의 cytokinin signaling 조절을 통해 유도. 하지만 본 유전자를 통한 조절 기작은 애기장대 AT-hook 유전자 및 *MtATPG1*의 조절 기작과는 차이가 있음. 따라서 반복적 그리고 보다 세밀한 분석을 수행하고자 함.
- *MtATPG2* 유전자의 높은 발현량은 녹기 연장의 형질과 더불어 산화 스트레스에 대한 저항성을 일부 제공함.

3) *AHL17* (AT-hook motif nuclear localized protein 17, At5g49700): 녹기연장과 다수성 형질

- ① **선행연구 요약:** 우리는 선행연구를 통하여 *AHL17*을 발굴하여 기능 분석을 수행하였으며, 그 결과를 간단히 요약하면 다음과 같다:

- 애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질(DNA-binding protein-related)로 알려진 *AHL17*은 약 29.4 kDa의 분자량을 갖는 276개의 아미노산을 암호화하는 831bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음
- *AHL17* 유전자의 과발현은 애기장대의 녹기 연장 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특징을 가지는데, 이러한 표현형적 특징은 *AHL17* 유전자의 과발현 정도에 따라 조절됨. 즉, *AHL17* 유전자의 발현이 상대적으로 높을수록 녹기 연장의 표현형질을, 그리고 유전자의 발현이 상대적으로 낮으면서 안정화를 유지하면 생산성 증대의 표현형질을 제공
- *AHL17* 유전자의 과발현에 의한 다수성 형질은 장각과 수의 생성 촉진을 통하여 종자 크기가 아닌 수의 증가를 유도하여 나타남. 이러한 다수성 형질 외에 *AHL17* 유전자의 과발현은 개체 생체량 및 생체 건량 증가와 같은 바이오매스 증대에 대한 형질을 제공
- *AHL17* 유전자의 과발현은 녹기 연장과 생산성 증대뿐 만 아니라 가뭄 및 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공



그림 30. *AHL17* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 발아 후 50일 그리고 70일째 표현형적 특징

② 본 과제 수행 연구 결과

세대 진전시 표현형 안정화: 본 과제에서 우리는 변이체의 다수성 형질에 대한 표현형질 안정성을 확인하기 위하여 확보된 과발현 변이체를 세대 진전시켜 그들의 표현형이 앞 세대의 표현형과 같은 지를 확인하였다. *AHL17* 유전자는 그들의 발현 정도에 따라 녹기 연장 혹은/그리고 다수성 형질을 제공한다. 따라서 후대에 발현 정도가 그대로 전달되어 표현형적 특징이 유지되는지를 확인하는 것은 매우 중요하다. 이러한 세대진전에 대한 표현형질의 안정화는 작물 개발에 있어 표현형질 안정화란 측면에서 매우 중요한 것으로 사료된다.

우리는 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들에 대한 표현형 확인을 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(그림 30). pCSEN-AHL17 구성체를 가지고 있는 *AHL17 ox-2*, *AHL17 ox-4*와 *AHL17 ox-6* 변이체 라인들은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, 식물체의 생산성 증대 현상이 뚜렷하게 나타났으며 흥미로운 점은 이들 변이체 중 *AHL17 ox-4*와 *AHL17 ox-6* 변이체 라인들은 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타났다. 생산성 증대 특성을 가지는 변이체들은 발아 후 50일 동안 생육했을 때는 개체 크기에 있어서 야생형에 비하여 비슷하거나 혹은 약간

작았으나, 발아 후 70일 동안 생육했을 때는 개체 크기 및 종자 생산량 증가와 같은 생산성 증대에 있어서 애기장대 야생형에 비하여 뚜렷한 증가 현상이 나타났다. 이러한 노화 지연 현상과 생산성 증대는 라인마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 본 유전자의 과발현이 라인마다 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 본 연구팀은 표현형의 안정화가 유지되었는지를 확인하기 위하여 상기 라인당 20 라인의 후대를 확보하여 그들의 표현형적 특징을 확인하고 대표적인 형질을 가지는 후대 라인을 3 라인씩 제시하였다. 그림 31에서 보는 바와 같이 다수성 형질을 가지는 대표적인 라인인 *AHL17 ox-2*의 후대 라인인 *AHL17 ox-2-4*, *AHL17 ox-2-7* 그리고 *AHL17 ox-2-9* 라인 모두는 야생종에 비하여 뚜렷한 다수성 형질 및 바이오매스 증대 형질을 가지는 것으로 나타났다.



그림 31. *AHL17* 과발현 애기장대 T₃ 형질전환체의 발아 후 40일째 표현형적 특징. Bar indicates 1 cm.

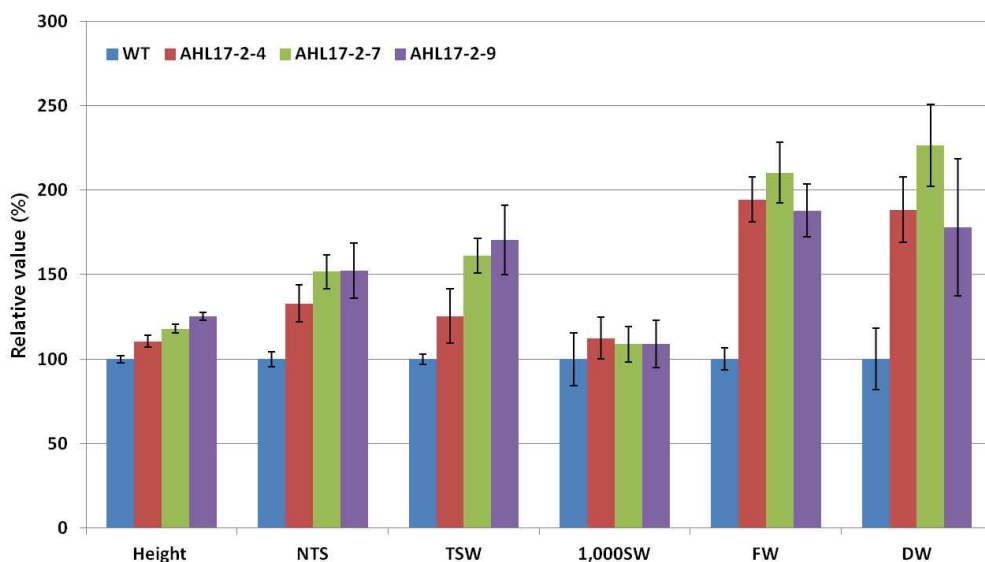


그림 32. *AHL17* 과발현 애기장대 T₃ 형질전환 라인의 생산성 증대 지표 분석(n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; FW, fresh weight of plant; DW, weight of plant after dry; TSW, total seed weight; 1000SW, total number of seeds thousand seed weight.

이러한 다수성 형질에 대한 표현형적 특징을 보다 정확히 분석하기 위하여 3종의 형질전환 라인을 대상으로 종자 수확량 등과 같은 생산성 지표를 조사하여 애기장대 대조구와 비교해 보았다(그림 32). 적용된 생산성 지표는 식물의 키(height), 장각과(silique) 수(NTS), 생체량(FW), 생체 건량(DW), 총 종자 무게(TSW), 그리고 1,000개의 종자 무게(1,000SW)이며, 결과는 라인별로 각 20개체의 평균값이다. 그 결과 *AHL17 ox-2-4*, *AHL17 ox-2-7* 그리고 *AHL17 ox-2-9* 라인 모두는 애기장대 대조구에 비하여 월등히 종자 생산이 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 *AHL17 ox-2-7* 그리고 *AHL17 ox-2-9* 라인은 대조구에 비하여 1.5배 이상의 종자 생산율을 나타내었다. 그림 32에서 보는 바와 같이 이러한 종자 생산의 증가는 변이체 라인들의 종자 크기와 관계없이 장각과 수의 증가에 기인하는 것으로 판단된다. 또한 *AHL17 ox-2-7* 그리고 *AHL17 ox-2-9* 라인 모두는 생체량과 건량 등과 같은 바이오매스의 증대에 있어서 야생형에 비하여 높은 것으로 나타났다. 이러한 사실은 *AHL17 ox-2*의 표현형질과 일치하였다.

한편 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타나고 발아 후 50일 동안 생육했을 때 개체 크기가 야생형에 비하여 약간 작은 *AHL17 ox-4*와 *AHL17 ox-6* 변이체 라인의 후대 라인인 *AHL17 ox-4-1*, *AHL17 ox-4-3* 그리고 *AHL17 ox-4-5* 라인 및 *AHL17 ox-6-2*, *AHL17 ox-8* 그리고 *AHL17 ox-6-12* 라인 모두는 *AHL17 ox-4*와 *AHL17 ox-6* 변이체 라인과 마찬가지로 보다 강력한 녹기 연장의 형질을 가지고 있었으며, 개체 크기는 야생종에 비하여 약간 작은 것으로 관찰되었다. 이러한 라인들은 이후 종자 수확시기까지 성장하여 야생종과 비슷한 개체 크기를 가지며, 다수성에 있어서는 야생종과 비슷하거나 높은 것으로 나타났다.

이러한 사실로 미루어보아 *AHL17* 유전자의 과발현이 세대진전에 있어서도 녹기 연장 및 다수성 형질에 대한 표현형적 형질의 안정화를 유지한다는 점에서 작물에 적용 시 다수성 형질의 안정적인 세대진전이 이루어 질 수 있으리라 판단된다. 상기 변이체들의 표현형적 차이는 선행 연구에서 언급하였듯이 아마 *AHL17* 유전자의 과발현 정도에 의해 나타나리라 판단되며, 추후 후대 라인들의 유전자 발현을 조사하여 실질적으로 유전자 발현 정도에 따라 표현형적 특징을 가지는 지를 확인하고 있는 중이다.

③ SUMMARY:

- 애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질(DNA-binding protein-related)로 알려진 *AHL17*은 약 29.4 kDa의 분자량을 갖는 276개의 아미노산을 암호화하는 831bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음
- *AHL17* 유전자의 과발현은 애기장대의 녹기 연장 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특징을 가지는데, 이러한 표현형적 특징은 *AHL17* 유전자의 과발현 정도에 따라 조절됨. 즉, *AHL17* 유전자의 발현이 상대적으로 높을수록 녹기 연장의 표현형질을, 그리고 유전자의 발현이 상대적으로 낮으면서 안정화를 유지하면 생산성 증대의 표현형질을 제공
- *AHL17* 유전자의 과발현에 의한 다수성 형질은 장각과 수의 생성 촉진을 통하여 종자 크기가 아닌 수의 증가를 유도하여 나타남. 이러한 다수성 형질 외에 *AHL17* 유전자의 과발현은 개체 생체량 및 생체 건량 증가와 같은 바이오매스 증대에 대한 형질을 제공
- *AHL17* 유전자의 과발현을 통한 녹기 연장의 표현형적 특징의 경우, *AHL22* 유전자와 마찬가지로

지로 분자적 수준에서 노화의 시작을 지연시키고, 이후 엽록소 함량, 광합성 효율 등과 같은 생리적 현상을 조

- *AHL17* 유전자의 과발현은 생산성 증대와 녹기 연장뿐 만 아니라 가뭄 및 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공
- 따라서 *AHL17* 유전자의 적절한 발현 조절은 다수안정성 작물 개발에 많은 장점을 제공할 뿐 만 아니라 작물의 스트레스 저항성 또한 제공하여 생산성 증대 및 스트레스 저항성 형질을 요구하는 작물의 개발에 많은 장점을 제공하리라 판단됨.

4) *AHL22* (AT-hook motif nuclear localized protein 22, At2g45430): 녹기연장과 다수성 형질

① **선행연구 요약:** 우리는 선행연구를 통하여 *AHL22*를 발굴하여 기능 분석을 수행하였으며, 그 결과를 간단히 요약하면 다음과 같다:

- 애기장대의 AT-hook motif nuclear-localized protein 22로 알려진 *AHL22*(GeneBank accession number NP_182067.1)는 약 33.5 kDa의 분자량을 갖는 317개의 아미노산을 암호화하는 954bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1개의 exon으로 구성되어 있음
- *AHL22* 유전자의 과발현은 애기장대의 녹기 연장 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특징을 가짐
- *AHL22* 유전자의 과발현에 의한 다수성 형질은 장각과 수의 생성 촉진을 통하여 종자 크기가 아닌 수의 증가를 유도하여 나타남. 이러한 다수성 형질 외에 *AHL22* 유전자의 과발현은 개체 생체량 및 생체 건량 증가와 같은 바이오매스 증대에 대한 형질을 제공
- *AHL22* 유전자의 과발현은 녹기 연장과 생산성 증대뿐 만 아니라 가뭄 및 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공

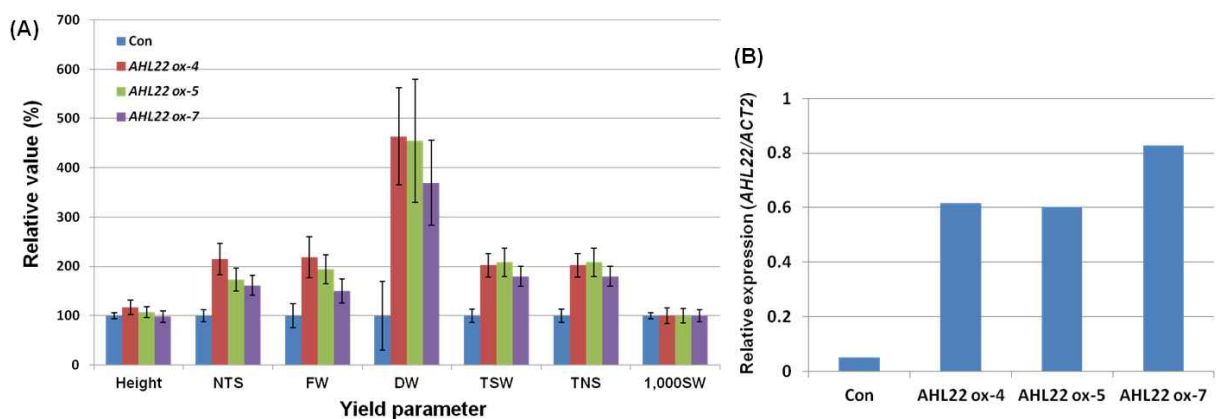


그림 33. *AHL22* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 생산성 증대 지표 분석, n=20 (A) 및 유전자 발현 분석, 양성대 조구는 *ACT* (B). Height; NTS, numbers of total silique per plants; FW, fresh weight of plant; DW, dry weight of plant; TSW, total seed weight; TNS, total seed number; 1000SW, total number of seeds thousand seed weight.

② 본 과제 수행 연구 결과

AHL22 유전자 발현 정도와 다수성 형질의 상관관계: 본 과제에서 우리는 변이체의 다수성 형질과 AHL22 유전자 발현 정도에 대한 상관관계를 밝히기 위하여 생산성 지표를 통한 다수성 형질 분석 및 과발현 변이체의 유전자 발현 정도를 조사하였다. 적용된 변이체 라인들은 AHL22 ox-4, AHL22 ox-5와 AHL22 ox-7이다. 먼저 다수성 형질 분석을 위하여 변이체 라인별로 종자 수확량 등과 같은 생산성 증대 지표를 적용하여 애기장대 대조구와 비교해 보았다. 적용된 생산성 증대 지표는 식물의 키(height), 장각과(silique) 수(NTS), 생체량(FW), 생체건량(DW), 총 종자 무게(TSW), 총 종자 수(TNS), 그리고 1,000개의 종자 무게(1,000SW)이며, 결과는 라인별로 각 20개체의 평균값이다. 그 결과, AHL22 ox-4, AHL22 ox-5와 AHL22 ox-7 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 종자 생산이 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 AHL22 ox-4와 AHL22 ox-5 변이체 라인들은 종자 생산량이 200% 이상 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 종자 생산의 증가는 조금은 차이가 있으나 변이체의 장각과 생산 증가와 비례하는 것으로 보아 본 유전자가 장각과 형성을 촉진함으로써 종자 생산량 증가를 제공하는 것으로 사료된다. 한편 종자 1,000개의 무게에서 변이체 전체는 대조구에 비하여 큰 변이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어보아 본 유전자의 발현은 종자의 개체 크기가 아닌 전체 무게의 증가에 영향을 미치는 것으로 판단되며, 이러한 형질은 본 유전자가 화기 형성을 촉진하여 전체 장각과 형성의 증가를 유도하여 결과적으로 전체 종자 무게의 증가를 유발하는 것으로 판단된다. 그리고 생체량과 생체 건량에 있어서도 과발현 변이체는 대조구에 비하여 뚜렷한 증가 현상을 보였다. 흥미로운 사실은 이들 변이체 모두 생체량에 비하여 생체건량에 있어서 엄청난 증가 현상은 가진다는 것이다. 이러한 사실로 미루어 보아 본 유전자 발현은 생체건량 증가와 같은 바이오매스 증대에 효과가 있음을 시사한다. 상기의 내용을 종합해보면 AHL22 유전자가 종자 생산량 증가와 더불어 생체량/생체건량 증가와 같은 바이오매스 증가와 같은 작물의 생산성 증대를 유발하는 것으로 생각된다(그림 33A). 이러한 다수성 형질이 AHL22 유전자의 발현 정도와 관계가 있는지 우리는 과발현의 유전자 발현 정도를 조사하였다. 그 결과, 애기장대 야생종에 비하여 변이체 모두 과발현되어 있어 이들 과발현 라인 모두가 과발현 변이체임을 알 수 있었으며, 이 중 AHL22 ox-6은 AHL22 ox-4와 AHL22 ox-5 변이체 라인보다 발현율이 높음을 알 수 있었다(그림 33B). 이러한 사실은 앞서 본 연구팀에 의하여 발굴된 ATPG3, ATPG4, ATPG7 등과 같은 AT-hook 패밀리 유전자와 마찬가지로 AHL22 유전자의 발현 정도가 낮은 상태의 적정 수준에서 유지되면 다수성 형질을 제공하는데 있어서 보다 강력할 것으로 판단되며, 높으면 높을수록 다수성 형질보다는 선행연구에서 언급하였듯이 녹기연장의 형질 제공에 보다 강력할 것으로 판단된다. 또한 흥미로운 사실은 다수성에 대한 농업형질을 가지는 변이체 라인들의 수확 시기는 애기장대 대조구와 큰 차이가 없다는 것이다. 이러한 사실은 본 유전자의 과발현 조절로 인한 생산성 증대는 대조구의 수확시기가 비슷하여 작물의 수확시기에 대한 문제점을 최소화할 수 있다는 것이다.

⑤ AHL22 과발현 변이체의 노화 조절에 대한 특성 분석: 선행 연구를 통하여 녹기연장의 표현형적 특징을 가지는 AHL22 과발현 변이체의 나이-의존적 노화 지연 형질을 보다 자세히 밝히기 위하여, T₂ 세대에서 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽(rossette leaf)을 매 4일마다 40일까지 표현형 관찰 및 노화 관련 유전자의 발현율을 측정하여 애기장대 대조구와 비교하였다.

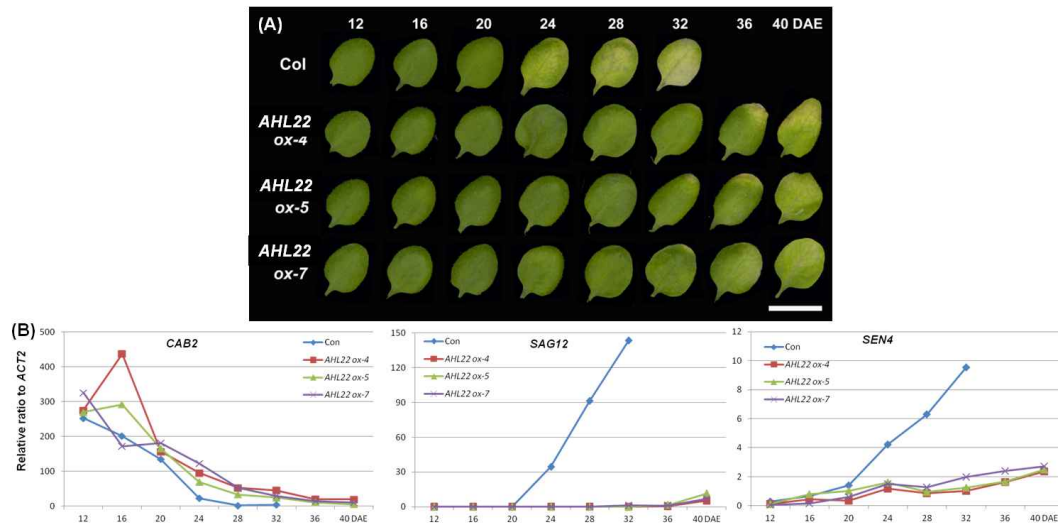


그림 34. *AHL22* 과발현 형질전환체의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징(A) 및 노화 마커 유전자의 발현 양상, 양성 대조구는 *ACT2*(B). Bar indicates 1 cm.

자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 라인별로 각 6개체 이상에서 관찰하였다. 그 결과, 야생종에 비해 노화 현상이 급격하게 나타났으며 32일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *AHL22 ox-4*, *AHL22 ox-5*와 *AHL22 ox-7*의 경우 잎의 황화 현상이 36일 이후부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일 이후부터 일어남을 확인할 수 있었다(그림 34A). 이러한 사실로 미루어보아, *AHL22* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다. 그리고 *AHL22 ox-7* 변이체는 *AHL22 ox-4*와 *AHL22 ox-5* 변이체에 비하여 노화지연의 표현형질이 좀 더 뚜렷함을 알 수 있었다. 이러한 사실은 앞서 유전자 발현 정도 분석 결과에서처럼 본 유전자의 발현이 높으면 높을수록 노화 지연의 표현 형질이 강력해짐을 시사한다.

야생종과 *AHL22* 과발현 변이체에서 노화 관련 유전자(senescence-associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 나이-의존적 노화 과정 동안 시간 경과에 따른 각 노화 관련 유전자들의 발현 양상을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다. 노화 마커 유전자로는 *SAG12*, *SEN4* 및 *CAB2* 유전자를 사용하였으며, qRT-PCR 양성 대조구로는 *ACT2* 유전자를 사용하였다. 야생종의 경우, *CAB2*(엽록소 a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 감소하였으나, *AHL22* 과발현 변이체들은 *CAB2*의 발현 감소가 지연되는 것으로 나타났다. 노화의 signal로 사용되는 *SAG12* 발현의 경우, 야생종은 20일에 발현되어 32일째 최대 발현을 나타내는 반면, *AHL22* 과발현 변이체들은 40일까지 증가 현상이 거의 나타나지 않았으며, 식물의 노화 동안 점진적으로 발현이 증가되는 것으로 알려진 *SEN4*의 발현은 야생종에서는 32일째 발현이 최대로 증가하는 반면, *AHL22* 과발현 변이체들은 노화 과정 동안 *SEN4*의 발현 증가가 지속적으로 일어나나 큰 증가폭을 나타내지 않았으며, 변이체의 *SEN4* 발현 정도는 야생종의 노화 동안의 발현 정도에 비하여 현저히 낮음을 알 수 있었다(그림 34B). 이러한 사실을 종합해보면 *AHL22* 유전자는 분자적 수준에서 노화의 시작을 지연시키고, 이후 엽록소 함량, 광합성 효율 등과 같은 생리적 현상을 조절함으로써 결과적으로 표현형적으로 잎 수명의 연장을 유발하는 것으로 판단된다.

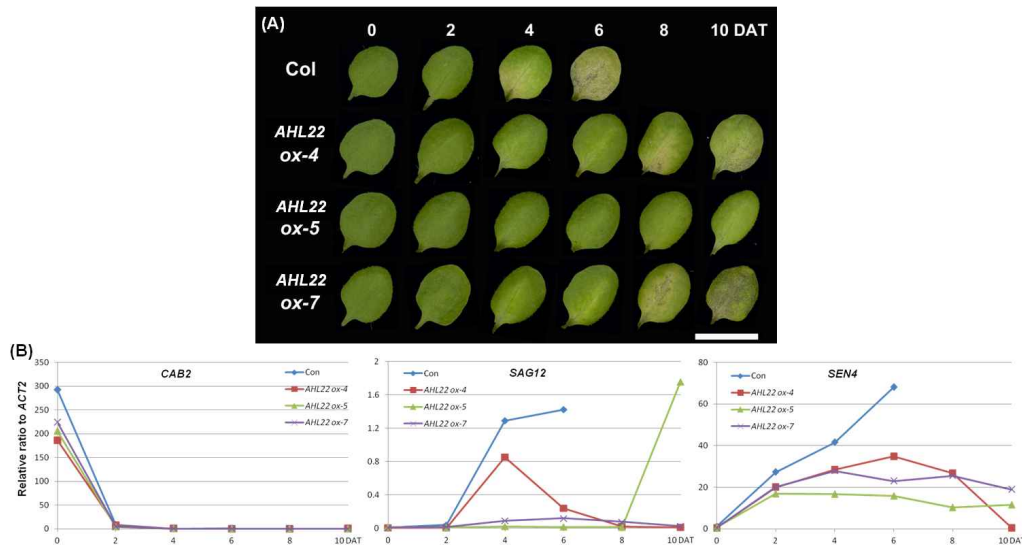


그림 35. *AHL22* 과발현 형질전환체의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징 (A) 및 노화 마커 유전자의 발현 양상, 양성 대조구는 *ACT* (B). Bar indicates 1 cm.

노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 *AHL22* 과발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T₂ 세대에서 발아 후 21일째 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 detach하여 3 mM MES 완충용액 (2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰을 각 변이체 라인별로 6개체를 대상으로 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후 4일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 6일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *AHL22 ox-4*, *AHL22 ox-5*와 *AHL22 ox-7*의 경우 잎의 황화 현상이 야생형에 비하여 지연되는 것으로 보여지며(그림 35A), 암 처리에 의한 노화 동안 엽록소 함량과 광합성 효율 변화에 있어서도 야생종에 비하여 *AHL22* 변이체들은 정도의 차이는 있지만 함량 및 활성 감소가 지연됨을 알 수 있었다(data not shown). 또한, 노화 지표 유전자인 *SEN4*와 *SAG12*, 그리고 광의존적 유전자인 *CAB2*의 발현을 암-유도 노화동안 조사해 본 결과, 그림 35B에 도시된 바와 같이, 야생형에 비하여 *AHL22* 변이체들은 *CAB2*의 발현 감소는 유사하였으나 *SAG12*의 발현은 지연되고, *SEN4*의 발현율은 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 사실로 미루어 보아 *AHL22* 유전자는 노화 지표 유전자의 발현 시기를 늦추거나 혹은 발현율을 억제시켜 노화를 지연시키는 것으로 판단된다.

⑥ SUMMARY:

- 애기장대의 AT-hook motif nuclear-localized protein 22로 알려진 *AHL22*(GeneBank accession number NP_182067.1)는 약 33.5 kDa의 분자량을 갖는 317개의 아미노산을 암호화하는 954bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1개의 exon으로 구성되어 있음
- *AHL22* 유전자의 과발현은 애기장대의 녹기 연장 및 생산성 증대에 대한 표현형적 특징을 가짐
- 이러한 표현형적 특징은 *AHL22* 유전자의 발현 정도에 따라 조절됨. 즉, *AHL22* 유전자의 발현 정도가 낮은 상태의 적정 수준에서 유지되면 생산성 증대 형질을 제공하는데 있어서 보

다 강력하며, 높으면 높을수록 생산성 증대 형질보다는 녹기연장의 형질 제공에 보다 강력할 것으로 판단됨.

- *AHL22* 유전자의 생산성 증대에 대한 표현형적 특징의 경우, *AHL22* 유전자의 과발현에 의한 다수성 형질은 장각과 수의 생성 촉진을 통하여 종자 크기가 아닌 수의 증가를 유도하여 나타남. 그리고 이러한 다수성 형질 외에 *AHL22* 유전자의 과발현은 개체 생체량 및 생체 건량 증가와 같은 바이오매스 증대에 대한 형질을 제공
- *AHL22* 유전자의 녹기 연장에 대한 표현형적 특징의 경우, *AHL22* 유전자는 분자적 수준에서 노화의 시작을 지연시키고, 이후 엽록소 함량, 광합성 효율 등과 같은 생리적 현상을 조절함으로써 결과적으로 표현형적으로 녹기 연장을 유발하는 것으로 판단됨.
- *AHL22* 유전자의 과발현은 생산성 증대와 녹기 연장뿐 만 아니라 가뭄 및 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공
- 따라서 *AHL22* 유전자의 적절한 발현 조절은 다수안정성 작물 개발에 많은 장점을 제공할 뿐만 아니라 작물의 노화 지연 기능을 제공하여 생산성 증대 및 녹기 연장 형질을 요구하는 작물의 개발에도 많은 장점을 제공하리라 판단됨.

5) *AMTG1* ([acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase of Genomine 1, At2g30200): 다수성 형질

본 연구팀은 AT-hook motif를 가진 유전자 외에 기능성 유전체연구를 통하여 확보된 변이체의 정보를 이용하여 다수성 형질을 제공하는 유용 유전자 *AMTG1*을 애기장대에서 발굴하여 그들의 기능 분석을 수행하였다. *AMTG1* 유전자는 식물의 특정 organelle, 엽록체 혹은 엽록체 stroma에서 fatty acid 생합성 경로의 상위에 관여하는 유전자로, 그 단백질은 Malonyl-CoA로부터 Malonyl-[acyl-carrier protein]로 전환 혹은 역방향으로 전환시키는 효소 기능을 가진다.

① 애기장대의 *AMTG1* 유전자 분리: 애기장대의 [acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase (GeneBank accession number NP_565697.1)의 염기서열을 기초로 하여 제한효소 *BglIII*의 서열이 포함된 정방향 primer(*BglIII*/AT2G30200-1 SOE-F, 5'-AGA TCT ATG CGT TCA CTG CTT CAC CGT A-3')와 제한효소 *BstEII*의 서열이 포함된 역방향 primer(*BstEII*/AT2G30200-1 SOE-R, 5'-GGT GAC CTC AAG CAC TGA TGT TTT CGA AAC-3')를 사용하여 애기장대 cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다. 상기 분리된 cDNA의 분석 결과, 약 41.5 kDa의 분자량을 갖는 393개의 아미노산을 암호화하는 1,182bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 10 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, 이를 *AMTG1*([acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase of GENOMINE 1)으로 명명하였다.

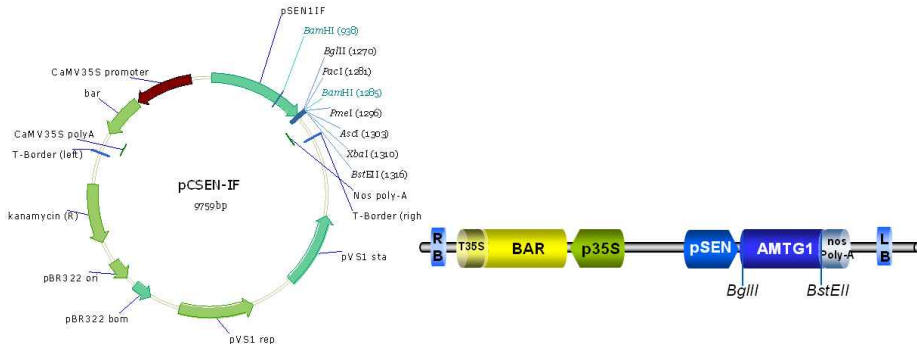


그림 36. *AMTG1* 유전자의 과발현을 위한 pCSEN-IF와 pCSENIF-AMTG1 vector의 모식도

② *AMTG1* 과발현 변이체의 표현형적 특징 및 다수성 형질 분석: 상기 유전자가 식물의 다수성 형질을 제공하는지를 확인하기 위하여 *AMTG1* 유전자가 센스 방향으로 도입된 애기장대 형질전환체를 제조하여 *AMTG1* 전사체의 발현을 변화시켰다. 사용된 벡터는 유도성 프로모터 (inducible promoter)인 SEN1 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN-IF 벡터이며, 유전자를 센스 방향으로 클로닝하여 *AMTG1* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSENIF-AMTG1 재조합 벡터를 제작하였다(그림 36). 상기 SEN1 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다. 벡터에서 BAR는 바스타 제초제에 대한 저항성을 부여하는 *BAR* 유전자(phosphinothricin acetyltransferase gene)를 가리키고, RB는 오른쪽 경계(Right Border), LB는 왼쪽 경계(Left Border), P35S는 CaMV 35S 프로모터, 35S-A는 CaMV 35S RNA polyA, PSEN은 *SEN1* 프로모터, Nos-A는 노파린 합성 유전자(nopaline synthase gene)의 polyA를 가리킨다.

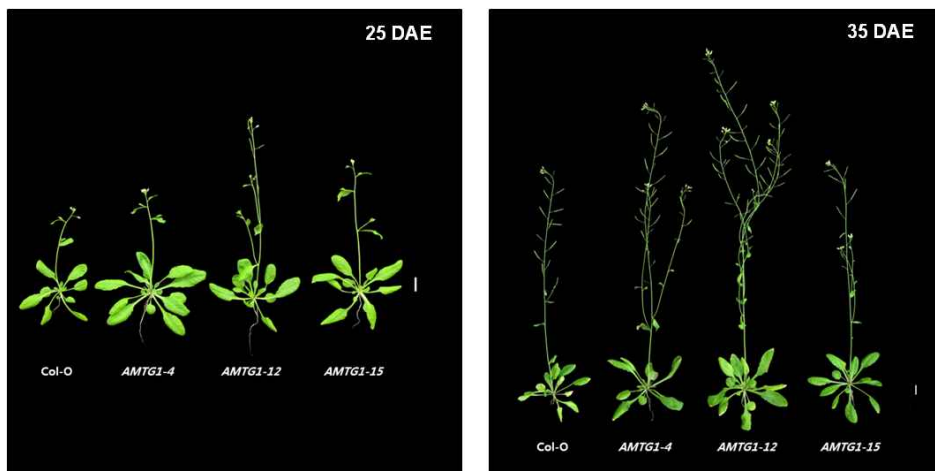


그림 37. *AMTG1* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 자엽생성 후 25일째, 그리고 35일째의 표현형적 특징. Bars indicate 1 cm.

상기 pCSENIF-AMTG1 재조합 벡터를 이용한 아그로박테리움-매개 형질전환 기법을 통하여 형질전환체를 생산하여 기능 분석에 적용하였다. 기능 분석에 있어서 대조구로는 형질전환하지 않은 야생형(wild type) 애기장대 또는 *AMTG1* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN-IF 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.

pCSENI-AMTG1 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대는 대조구와 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 흥미롭게도 변이체들은 뚜렷한 다수성 형질 및 바이오매스 증대 형질을 보였다. 이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질전환 애기장대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 자엽생성 후 25일째와 35일째 수행하였다(그림 37). 그 결과 pCSENI-AMTG1으로 형질전환된 T₂ 애기장대 *AMTG1-4*, *AMTG1-12*와 *AMTG1-15*는 정도의 차이는 있지만 전체적으로 야생형에 비하여 바이오매스가 증대하였으며, 또한 종자 수확량에서도 다수성 형질을 가졌다.

이러한 다수성 형질에 대한 보다 정확한 분석을 위하여 3종의 형질전환 라인을 대상으로 종자 수확량 등과 같은 생산성 지표를 조사하여 애기장대 대조구와 비교해 보았다(그림 38). 적용된 생산성 지표는 식물의 키(height), 장각과(silique) 수(NTS), 생체량(FW), 생체 건량(DW), 총 종자 무게(TSW), 그리고 1,000개의 종자 무게(1,000SW)이며, 결과는 라인별로 각 20 개체의 평균값이다.

AMTG1 유전자 과발현 변이체 라인, *AMTG1-4*, *AMTG1-12*, 그리고 *AMTG1-15* 모두는 애기장대 대조구에 비하여 1.7배 이상의 종자 생산이 증가하는 것으로 나타났으며, 이러한 종자 생산의 증가와 비례하여 모든 변이체 라인들은 장각과 수의 증가 패턴을 가졌다. 한편 종자 1,000개의 무게는 약간의 차이는 있으나 거의 대부분이 대조구와 비슷한 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어보아 *AMTG1* 유전자의 발현은 종자 크기에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각되는 반면, 장각과 수의 증가를 유도하여 최종적으로 종자 생산량 증가를 이끄는 것으로 생각된다. 그리고 식물체의 크기에는 변이체와 대조구에 있어서 큰 차이가 없었으나 생체량과 생체 건량에 있어서는, 특히 생체 건량에 있어서는 변이체 모두는 대조구에 비하여 뚜렷한 증가 현상이 나타났다. 따라서 본 유전자의 콩 품종 개발에 대한 적용은 다수성 형질 및 바이오매스 증대와 같은 생산성 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 판단된다.

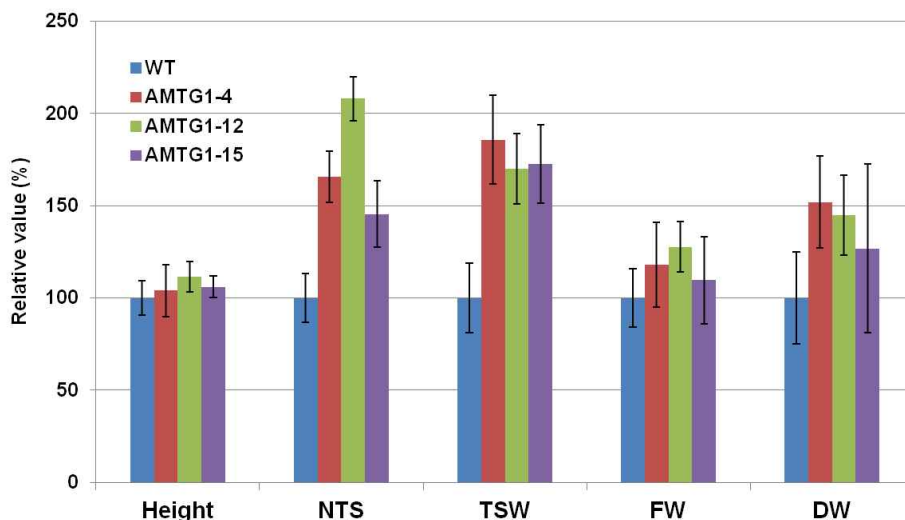


그림 38. *AMTG1* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환 라인의 생산성 증대 지표 분석(n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; FW, fresh weight of plant; DW, weight of plant after dry; TSW, total seed weight; 1000SW, total number of seeds thousand seed weight.

③ **AMTG1 과발현 변이체의 지방산 분석:** 우리는 *AMTG1* 유전자가 지방산 생합성 경로의 상위 레벨에서 작용한다는 사실에 기인하여 본 유전자가 종자 크기 및 무게, 그리고 지방산 조성비 및 함량을 조절하는지를 분석하였다. 우선 우리는 T₂ 형질전환 애기장대로부터 T₃ 종자를 수확하여 그 크기를 해부현미경으로 관찰하였다. 그 결과 과발현 변이체 *AMTG1 ox4-3*, *AMTG1 ox4-9*, *AMTG1 ox4-10*, *AMTG1 ox4-12*, *AMTG1 ox12-7* 그리고 *AMTG1 ox15-11*은 애기장대 야생형과 비교해 보았을 때, 종자의 크기에 있어서 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다(그림 39). 또한 100개의 종자 무게(백립중)도 과발현 변이체들과 야생형이 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다(data not shown).

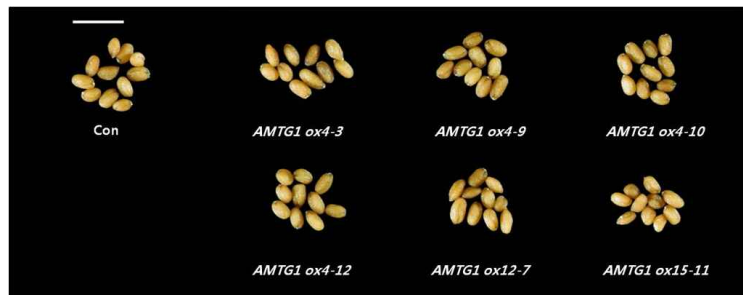


그림 39. *AMTG1* 과발현 애기장대 T₃ 형질전환 라인의 종자에 대한 해부학적 표현형. *AMTG1 ox4-3*, *AMTG1 ox4-9*, *AMTG1 ox4-10*, *AMTG1 ox4-12*, *AMTG1 ox12-7* and *AMTG1 ox15-11*: seeds of T₃ transgenic lines.

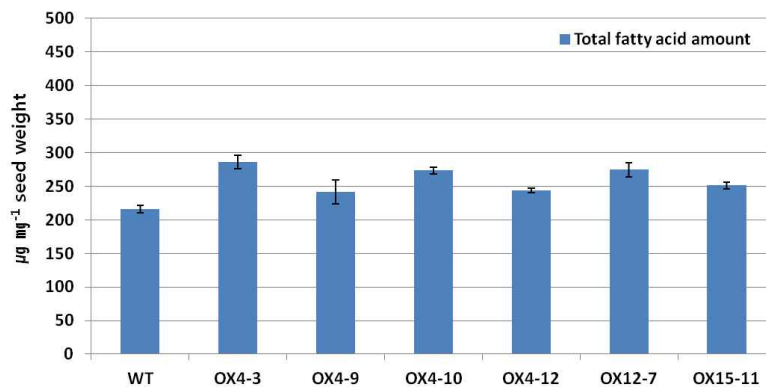


그림 40. *AMTG1* 과발현 애기장대 T₃ 형질전환 라인의 종자에 대한 총 지방산 함량 (n=20). OX4-3, OX4-9, OX4-10, OX4-12, OX12-7 and OX15-11: seeds of T₃ transgenic lines.

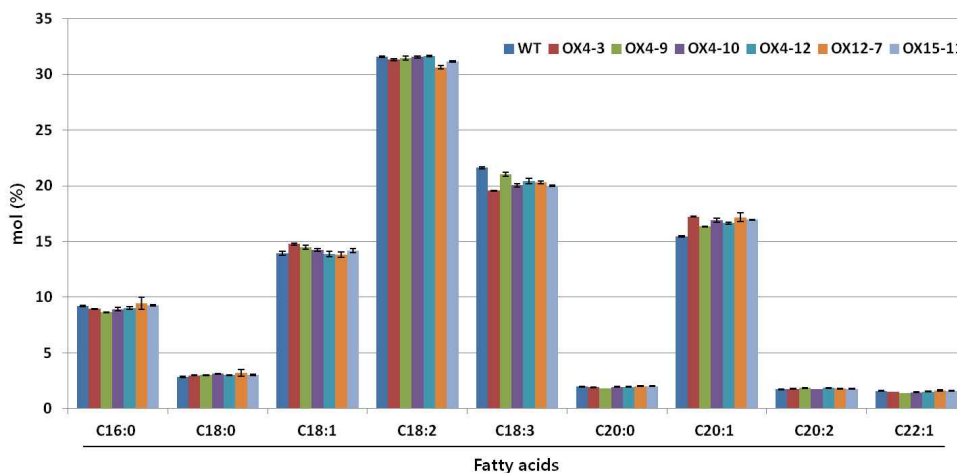


그림 41. *AMTG1* 과발현 애기장대 T₃ 형질전환 라인의 종자에 대한 지방산 조성비 (n=20). OX4-3, OX4-9, OX4-10, OX4-12, OX12-7 and OX15-11: seeds of T₃ transgenic lines.

우리는 상기 변이체 라인의 종자들을 대상으로 총 지방산 함량과 지방산 조성에 대한 분석을 수행하였다. 그 결과 과발현 변이체 *AMTG1* α 4-3(OX4-3), *AMTG1* α 4-9(OX4-9), *AMTG1* α 4-10(OX4-10), *AMTG1* α 4-12(OX4-12), *AMTG1* α 12-7(OX12-7) 그리고 *AMTG1* α 15-11(OX15-11) 종자는 애기장대 야생형과 비교해 보았을 때, 총 지방산 함량이 약간 증가하는 것으로 나타났으나(그림 40), 증가 효과는 그다지 크지 않은 것으로 판단된다. 그리고 지방산 조성에 대한 분석 결과 *AMTG1* 과발현 변이체 모두는 야생형과 비교해 보았을 때, 지방산 조성비 변화는 거의 일어나지 않았다(그림 41).

이러한 사실로 미루어보아 *AMTG1* 유전자는 식물의 지방산 함량에는 일부 영향을 미치는 반면, 조성비 변화에는 큰 영향을 미치지 않고, 또한 식물의 종자 크기 및 무게 변화에 효과가 별로 없는 것으로 사료된다. 따라서 *AMTG1*은 식물의 지방산 경로에 있어서 직접적인 지방산 생합성보다는 지방산 생합성 상위에서 유전자 발현을 조절하여 지방산 생합성이 아닌 다른 대사과정을 조절하여 식물의 성장을 조절하는 것으로 판단된다.

④ *AMTG1* 과발현 변이체의 지방산 생합성 경로에 대한 분자생물학적 분석: 우리는 *AMTG1* 유전자가 지방산 생합성 경로에 관여하는지를 밝히기 위하여 지방산 생합성 경로 관련 유전자의 발현 양상을 조사하였다. 적용된 유전자와 *AMTG1*, 그리고 양성대조구인 tubulin에 대한 RT-PCR용 primer 정보는 표 11과 같다.

표 11. Fatty acid 생합성 경로에 관여하는 유전자들, *AMTG1*, 그리고 양성 대조구 tubulin 유전자에 대한 RT-PCR용 primer 정보

GENE	Primer Information
AT1G62640 (KASIII)	KASIII-RT-F: 5'- GGGTCTAGTTTCAGCTGCTT -3' KASIII-RT-R: 5'- CGATATGACTCTCTCTGGTG -3'
AT1G08510 (FATB)	FATB-RT-F: 5'- GGCTGAGAAACAGTGGATGA -3' FATB-RT-R: 5'- GGCAAGGACAGGATCAGAAT -3'
AT3G25110 (FATA)	FATA-RT-F: 5'- AGAGTGAAGGAAGGATTGGG -3' FATA-RT-R: 5'- AATTTAGAGGTGGTGGTGG -3'
AT4G13050 (OAT2)	OAT2-RT-F: 5'- GCTTGAGTGATGTGGTTGA -3' OAT2-RT-R: 5'- GGTTTCAGAGGTGGTAAGTG -3'
AT2G43710 (SAD2)	SAD2-RT-F: 5'- TAAGAGAGAGGGCTAGAGAG -3' SAD2-RT-R: 5'- GGAAGAGAAGTTGTCAAAGAG -3'
AT3G02630 (SAD5)	SAD5-RT-F: 5'- GGGTAGACATGAGGCAGATT -3' SAD5-RT-R: 5'- AGTCCTTGGCAGTGTAGACA -3'
AT5G16230 (SAD6)	SAD6-RT-F: 5'- CATGGCAACCACAAGACTTC -3' SAD6-RT-R: 5'- GCTTCTCCACTATCTTCGTG -3'
AT5G16240 (SAD7)	SAD7-RT-F: 5'- GTACCTTTATCTGTCTGGAC -3' SAD7-RT-R: 5'- CAACTTCTCCACATTCCACC -3'
AMTG1	BglIII/AT2G30200 SOE-F: 5'- AGATCTATGCGTTCAGTCTTCACCGT -3' BstEII/AT2G30200 SOE-R: 5'- GGTGACCTCAAGCACTGATGTTTTCGAAAC -3'
Tubulin	TUB-F : 5'- CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA -3' (21mer) TUB-R : 5'- TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3' (21mer)

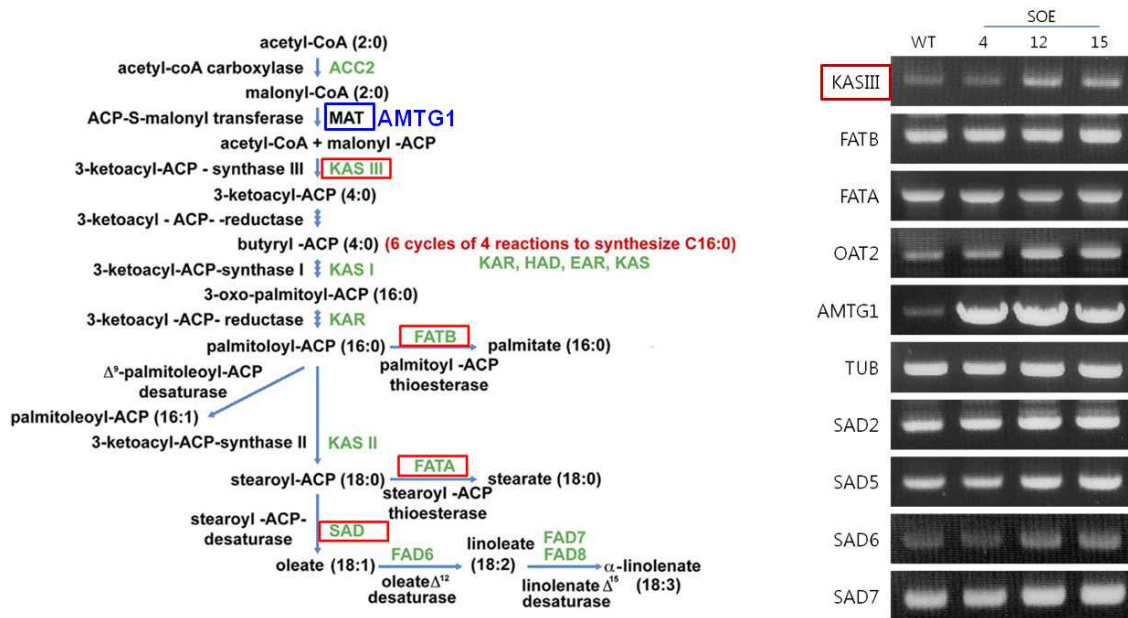


그림 42. Fatty acid 생합성 경로(왼쪽)와 이에 관여하는 유전자들, *AMTG1*, 그리고 양성 대조구 tubulin 유전자에 대한 RT-PCR을 통한 발현 양상.

그 결과, *AMTG1* 유전자는 지방산 생합성에 관련한 유전자중 *FATA*와 *FATB*의 발현에는 거의 영향을 미치지 않았으며, *OAT2*와 *SAD* 유전자 일부에 있어서는 미약하게 발현 조절을 제공하는 것으로 나타났으나, 전체적으로 보면 지방산 생합성 관련 유전자의 발현에는 큰 영향을 끼치지 않았다. 이러한 결과는 앞선 지방산 함량 및 조성비 변화의 결과와 일치하였다. 한편 *AMTG1* 유전자는 흥미롭게도 *KASIII* 유전자의 발현 증가를 유도하였다(그림 42). 이러한 사실로 미루어보아 *AMTG1* 유전자는 직접적으로 지방산 생합성에 관여하기 보다는 *KASIII* 유전자의 발현 조절을 통해 식물의 성장·발달에 있어서 다른 대사과정을 조절함으로써 식물의 바이오매스 증대 및 종자수확량 증가와 같은 생산성 증대 형질을 제공하는 것으로 판단된다.

⑥ SUMMARY:

- 애기장대의 [acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase로 알려진 *AMTG1*(GeneBank accession number NP_565697.1)는 약 41.5 kDa의 분자량을 갖는 393개의 아미노산을 암호화하는 1,182bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 10개의 exon으로 구성되어 있음
- *AMTG1* 유전자의 과발현은 애기장대의 다수성 형질 및 바이오매스 증대와 같은 생산성 증대에 대한 표현형적 특징을 가짐
- *AMTG1* 유전자의 과발현은 종자 크기 및 지방산 조성비 변화에 거의 영향을 미치지 않음.
- *AMTG1* 유전자는 흥미롭게도 *KASIII* 유전자의 발현 증가를 유도.
- 따라서 *AMTG1* 유전자는 직접적으로 지방산 생합성에 관여하기 보다는 *KASIII* 유전자의 발현 조절을 통해 식물의 성장·발달에 있어서 다른 대사과정을 조절하여 식물의 바이오매스 증대 및 종자수확량 증가와 같은 생산성 증대 형질을 제공하는 것으로 판단됨.

6) *GmATPGs* (*Glycine max* AT-hook protein of Genome)

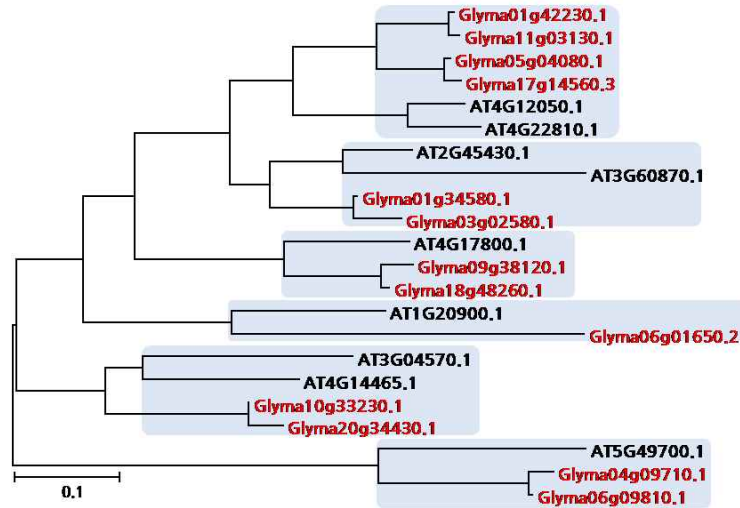


그림 43. AT-hook domain을 가지는 애기장대와 콩 유전자의 phylogenetic tree 분석

본 연구팀은 애기장대의 AT-hook motif를 함유한 많은 유전자들이 다수성 및 녹기 연장에 대한 표현형적 특징을 가지고 있으며, 최근 콩의 기원 식물인 *Medicago truncatula*의 At-hook 유전자 또한 다수성에 대한 표현형적 특징을 가짐을 알 수 있었다. 우리는 콩의 AT-hook 유전자들 또한 다수성에 대한 표현형적 특징을 가질 것이라 추측하고, 콩의 AT-hook 유전자를 분리하였다. BLASTp를 통하여 애기장대 AT-hook 유전자에 대한 homology를 가지는 콩의 상위 10개의 콩의 locus를 추출하여 multiple alignment 및 phylogenetic tree 분석(그림 43)을 통해서 ortholog gene을 분리하였다.

표 12. 애기장대 AT-hook gene에 대한 *Glycine max* ortholog gene 분리를 위한 primer 정보

■ pCSENIIF ■ pENTR

GENE ID	Primer Name	Primer Sequence (5'- Oligo Seq -3')
Glyma01g42230	S-Gm1-F	TTAATTAATGGATCCTATTACAGCACACG
	S-Gm1-R	GGCGCGCCTCAGTATGGAGAGCGACCC
	E-Gm1-F	CACCATGGATCCTATTACAGCACACG
	E-Gm1-R	TCAGTATGGAGAGCGACCC
Glyma11g03130	S-Gm2-F	TTAATTAATGGATCCTATTACAGCACATGG
	S-Gm2-R	GGCGCGCCTCAGCAGTAAGGAGAGCGAC
	E-Gm2-F	CACCATGGATCCTATTACAGCACATGG
	E-Gm2-R	TCAGCAGTAAGGAGAGCGAC
Glyma05g04080	S-Gm3-F	TTAATTAATGGATCCAATCTCGGCACATG
	S-Gm3-R	GGCGCGCCTCAGAAAAGGCGGGCGAGC
	E-Gm3-F	CACCATGGATCCAATCTCGGCACA
	E-Gm3-R	TCAGAAAAGGCGGGCGAGC
Glyma17g14560	S-Gm4-F	TTAATTAATGGATCCAATCTCGGCA
	S-Gm4-R	GGCGCGCCTCAGAAAAGGTGGGCGAGTAG
	E-Gm4-F	CACCATGGATCCAATCTCGGCA
	E-Gm4-R	TCAGAAAAGGTGGGCGAGTAG
Glyma01g34580	S-Gm5-F	TTAATTAATGCCAATCATCCCTACC
	S-Gm5-R	GGCGCGCCTTAAAAGGGAGGGCGAGC
	E-Gm5-F	CACCATGCCAATCATCCCTACC

	E-Gm5-R	TTAAAAGGGAGGGCGAGC
Glyma03g02580	S-Gm6-F	TTAATTAATGGATCCTGTTGCAGCAC
	S-Gm6-R	GGCGCGCCTTAAAAGGGAGGGCGAGC
	E-Gm6-F	CACCATGGATCCTGTTGCAGCAC
	E-Gm6-R	TTAAAAGGGAGGGCGAGC
Glyma09g38120	S-Gm7-F	TTAATTAATGGCCGGCATAGACTTG
	S-Gm7-R	GGCGCGCCTCAGTAAGATTGCCTTCCACC
	E-Gm7-F	CACCATGGCCGGCATAGACTTG
	E-Gm7-R	TCAGTAAGATTGCCTTCCACC
Glyma18g48260	S-Gm8-F	TTAATTAATGGCCGGCATAGACTTG
	S-Gm8-R	GGCGCGCCTCAGTAAGATTGCCTTCCACC
	E-Gm8-F	CACCATGGCCGGCATAGACTTG
	E-Gm8-R	TCAGTAAGATTGCCTTCCACC
Glyma06g01650	S-Gm9-F	TTAATTAATGACACCTGCAGCCCTAC
	S-Gm9-R	GGCGCGCCTAGAAAAGGATGAGTTTTGGGTG
	E-Gm9-F	CACCATGACACCTGCAGCCCTAC
	E-Gm9-R	CTAGAAAAGGATGAGTTTTGGGTG
Glyma06g01650	S-Gm10-F	TTAATTAATGGCAACTCTGGCAAATC
	S-Gm10-R	GGCGCGCCTCAGAAAAGGTGCTCGTCCAT
	E-Gm10-F	CACCATGGCAACTCTGGCAAATC
	E-Gm10-R	TCAGAAAAGGTGCTCGTCCAT
Glyma20g34430	S-Gm11-F	TTAATTAATGACCGTATTAGTAGAGGAAAGTACTAA
	S-Gm11-R	GGCGCGCCTCAGAAAAGGTGCTCGTCC
	E-Gm11-F	CACCATGACCGTATTAGTAGAGGAAAGTACTAA
	E-Gm11-R	TCAGAAAAGGTGCTCGTCC
Glyma04g09710	S-Gm12-F	TTAATTAATGAAAGGAGAATACGTAGAGCAACAGC
	S-Gm12-R	GGCGCGCCTCAGTAAGGCGGCGGCGG
	E-Gm12-F	CACCATGAAAGGAGAATACGTAGAGCAACAGC
	E-Gm12-R	TCAGTAAGGCGGCGGCGG
Glyma06g09810	S-Gm13-F	TTAATTAATGAAAGGAGAATACCTAGAGCAACA
	S-Gm13-R	GGCGCGCCTCAGTAAGGTGGTGGCGG
	E-Gm13-F	CACCATGAAAGGAGAATACCTAGAGCAACA
	E-Gm13-R	TCAGTAAGGTGGTGGCGG

우리는 이러한 분석을 통하여 현재 콩에서 9종의 유전자를 분리하였으며, 분리한 유전자는 다음과 같다: Glyma01g42230, Glyma11g03130, Glyma05g04080, Glyma17g14560, Glyma03g02580, Glyma09g38120, Glyma18g48260, Glyma10g33230, Glyma06g09810. 유전자 분리에 적용된 프라이머 정보는 표 12와 같으며, 분리된 유전자들은 pCSENIF 벡터와 pENTR 벡터에 센스 방향으로 클로닝을 진행하였다. 현재 pCSENIF 벡터의 경우, 9종 모두 형질전환용 벡터 construct 제작을 완료하여 애기장대 형질전환체 생산 및 기능 분석을 수행하고 있으며, 또한 콩 형질전환체 생산에도 적용하고 있다. pENTR 벡터의 경우, 9종 모두 형질전환용 벡터 construct 제작을 완료하여 콩 형질전환용 벡터 construct 제작에 적용하고 있는 중이다.

상기 유전자가 식물의 다수성 형질을 제공하는지를 확인하기 위하여 *GmATPGs* 유전자가 센스 방향으로 도입된 애기장대 형질전환체를 제조하여 *GmATPGs* 전사체의 발현을 변화시켰다. 사용된 벡터는 유도성 프로모터(inducible promoter)인 SEN1 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSENIF 벡터이며, 유전자를 센스 방향으로 클로닝하여 *GmATPGs* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSENIF-*GmATPGs* 재조합 벡터를 제작하였다(그림 44). 상기 SEN1 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

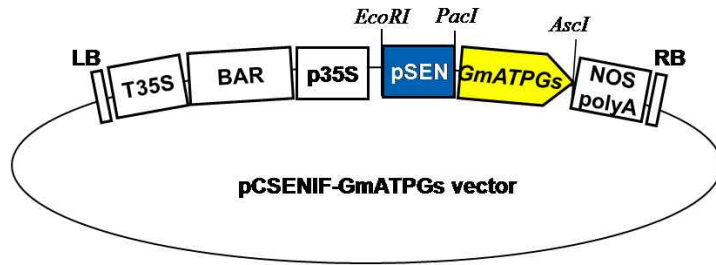


그림 44. *GmATPGs* 유전자의 발현을 위한 pCSENIF-GmATPGs vector의 모식도

상기 pCSENIF-GmATPGs 재조합 벡터를 이용한 아그로박테리움-매개 형질전환 기법을 통하여 형질전환체를 생산하여 라인당 20개체 이상에 대한 표현형적 특성을 분석하였다. 표현형적 특성 분석에 있어서 대조구로는 형질전환하지 않은 야생형(wild type) 애기장대 또는 *GmATPGs* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSENIF 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.

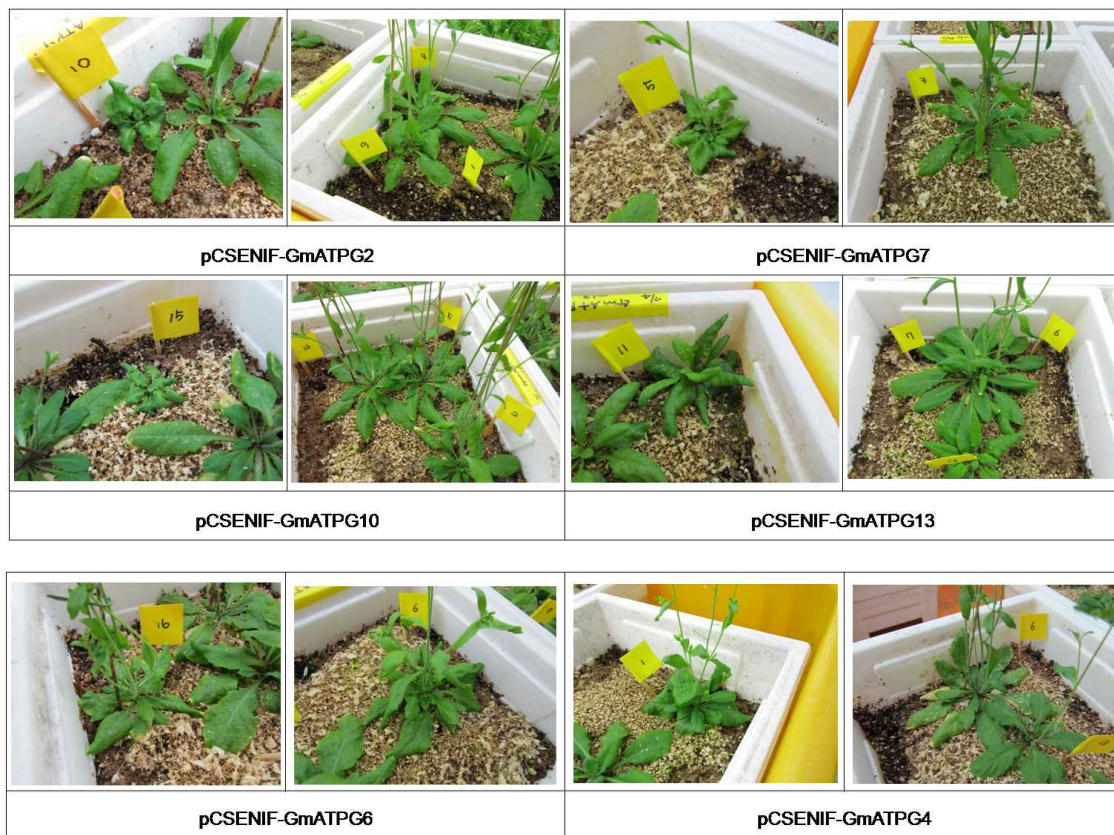


그림 45. *GmATPGs* 유전자 발현 애기장대 T₁ 형질전환체의 표현형적 특징. 각 라인의 왼쪽: cytokinin 과발현의 표현형 개체, 각 라인의 오른쪽: 바이오매스 증대 표현형 개체.

pCSENIF-GmATPGs 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대 라인들은 대조구와 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 흥미롭게도 변이체 라인들은 모두 바이오매스 증대의 표현형적 특징만 만

아니라 노화 지연과 표현형적 이상을 가지는 cytokinin 과발현의 표현형적 특징을 가졌다. 이러한 바이오매스 증대와 cytokinin 과발현의 표현형적 특징은 애기장대의 AT-hook 유전자의 과발현으로 인한 대표적인 표현형적 특징으로 본 연구팀은 확인하였다. 즉 도입 유전자의 발현에 있어서 낮거나 중간 정도의 발현은 바이오매스 증대, 다수성과 같은 생산성 증대 형질을 제공하는 반면 높은 발현은 노화 지연과 같은 cytokinin 과발현 표현형을 제공한다는 사실과 일치하였다. 따라서 본 연구팀은 콩에서 분리한 9종의 *GmATPGs* 모두를 생산성 증대 후보 유전자로 선정하였으며, 이들에 대해 세대 진전을 통한 기능분석을 수행하고 있다. 본 연구팀은 바이오매스 증대의 형질과 cytokinin 과발현의 표현형을 가지는 *GmATPGs* 라인 일부를 그림 45에서 제시하였다.

다. 콩 형질전환체 생산 및 기능 검정

다수성 형질을 가진 우량 콩 형질전환체를 개발하기 위하여 본 연구팀은 다수성 형질을 가진 기확보 유전자 및 신규 유용 유전자에 대한 형질전환 벡터 construct를 제작, 형질전환, 형질전환체 생산 및 형질전환체 기능 검정을 수행하였다.

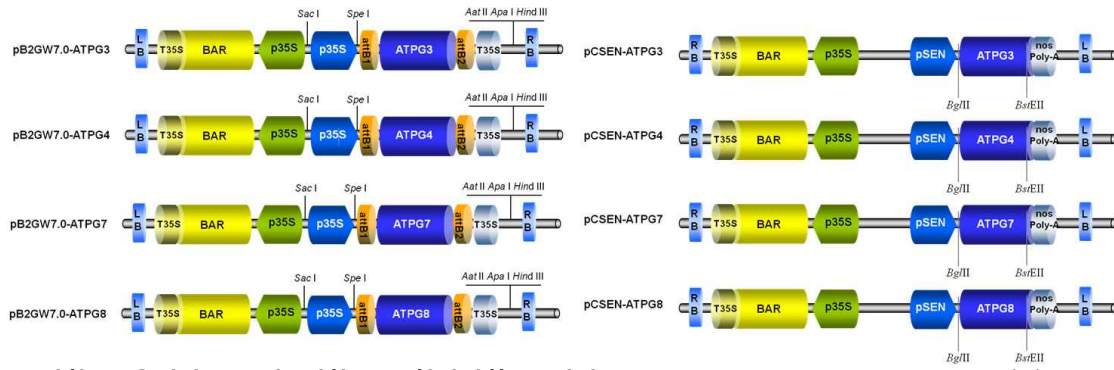


그림 46. 기확보 유전자 4종에 대한 콩 형질전환용 벡터 construct. 1) pB2GW7.0-ATPG3 벡터 construct, 2) pB2GW7.0-ATPG4 벡터 construct, 3) pB2GW7.0-ATPG7 벡터 construct, 4) pB2GW7.0-ATPG8 벡터 construct, 5) pCSEN-ATPG3 벡터 construct, 6) pCSEN-ATPG4 벡터 construct, 7) pCSEN-ATPG7 벡터 construct, 8) pCSEN-ATPG8 벡터 construct. RB, right border; LB, left border; PPT, DL-phosphinothricin resistance; 35S, CaMV 35S promoter; T35S, terminator.

1) 콩 형질전환용 벡터 construct 제작

다수성 형질을 가진 우량 콩 형질전환체를 개발하기 위하여 본 연구팀은 다수성 형질을 가진 기확보 유전자 및 신규 유용 유전자에 대한 형질전환 벡터 construct를 제작하였다. 기확보 유전자 *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7* 그리고 *ATPG8*에 대한 형질전환 벡터는 그림 46과 같으며 1차년도에 제작 완료하였고, 신규 발굴한 유전자인 *MtATPG1*, *MtATPG2*, *AHL17* 그리고 *AHL22*는 GM 작물 개발에 있어서 특히 최소 회피 혹은 발달 단계에 대한 인위적 조절이 가능한 pCSENIF 벡터에 유전자를 도입, 그리고 pENTR vector를 사용하여 유용 유전자를 항시 발현 벡터인 pB2GW7.0에 도입한 콩 형질전환용 벡터 8종을 제작 완료하였다(그림 47).

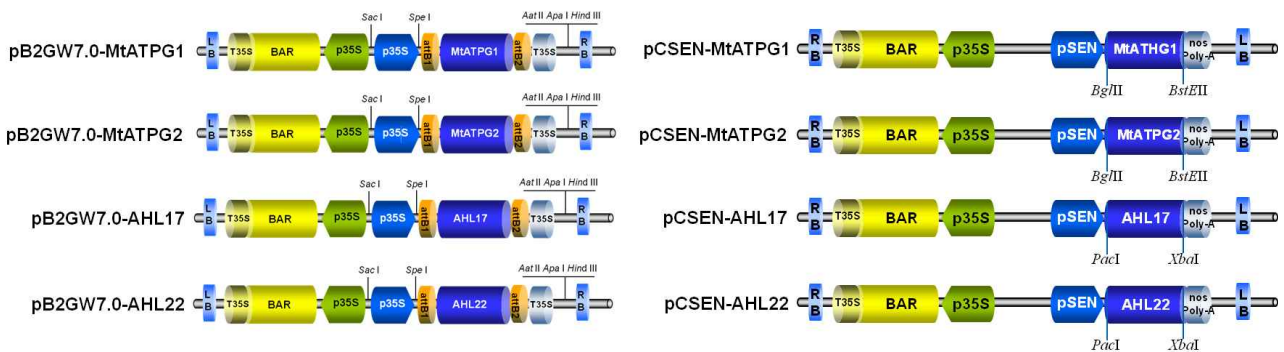


그림 47. 신규 유전자 4종에 대한 콩 형질전환용 벡터 construct. 1) pB2GW7.0-MtATPG1 벡터 construct, 2) pB2GW7.0-MtATPG2 벡터 construct, 3) pB2GW7.0-AHL17 벡터 construct, 4) pB2GW7.0-AHL22 벡터 construct, 5) pCSEN-MtATPG1 벡터 construct, 6) pCSEN-MtATPG2 벡터 construct, 7) pCSEN-AHL17 벡터 construct, 8) pCSEN-AHL22 벡터 construct.

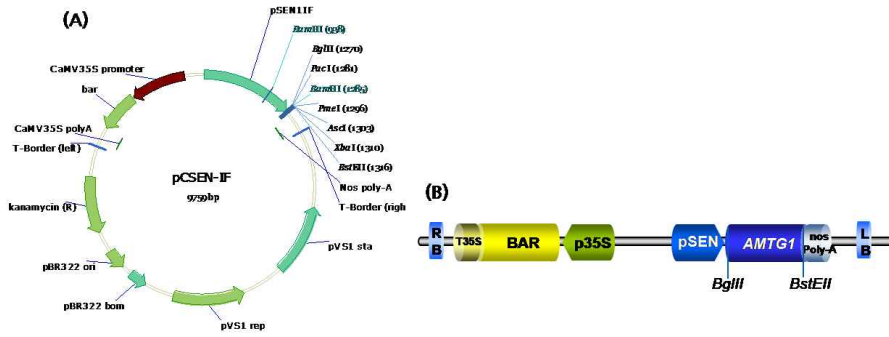


그림 48. 3차년도에 발굴한 신규 유전자 *AMTG1* 유전자의 콩 형질전환을 위한 pCSEN-IF(A)와 pCSENIF-AMTG1(B) vector의 모식도

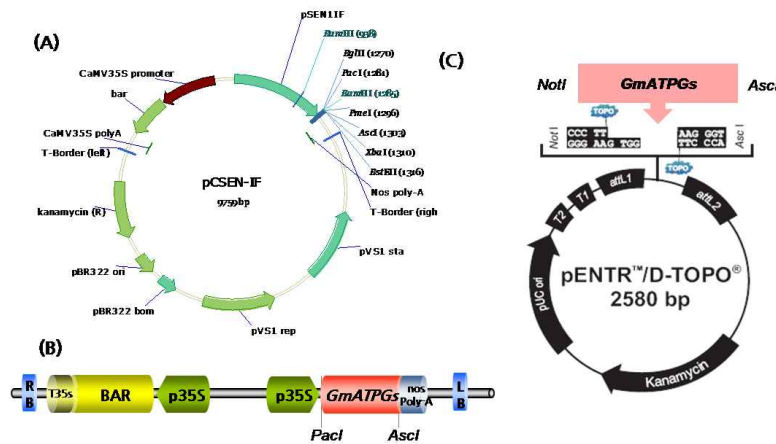


그림 49. 3~4차년도에 발굴중인 신규 유전자 *GmATPG* 유전자 9종의 콩 형질전환을 위한 pCSEN-IF(A)와 pCSENIF-GmATPGs(B), 그리고 pENTR-GmATPGs(C) vector의 모식도.

3차년도에 신규 발굴한 유전자인 *AMTG1*은 GM 작물 개발에 있어서 특히 최소 회피 혹은 발달 단계에 대한 인위적 조절이 가능한 pCSENIF 벡터에 유전자를 도입하여 형질전환용 벡터 construct를 제작을 완료하여(그림 48), 현재 콩 형질전환 및 형질전환체 생산을 진행하고 있다. 한편 3~4차년도에 신규 발굴중인 9종의 *GmATPGs*는 pCSENIF 벡터에 유전자를 도입하여 형질전환용 벡터 construct 제작을 완료하여 순차적으로 콩 형질전환 및 형질전환체 생산을 진행하고 있으며, pENTR vector로의 유전자 도입 또한 완료되어 현재 이를 항상 발현 벡터인 pB2GW7.0에 도입을 진행하고 있다(그림 49).

2) 콩 형질전환체 생산 및 기능 검증

본 연구팀은 기 확보 유전자 4종 및 신규 유전자 6종 이상의 vector construct에 대한 콩 형질전환을 수행하였으며, 적용된 고효율 형질전환 기법 및 재분화 단계는 다음과 같다.

침지해 놓은 종자의 양 떡잎 사이로 외과용 메스(scapel)를 넣어 하배축까지 수직으로 자르고 종피를 제거하였다. 배축을 떡잎 밑 약 1 cm되는 곳에서 자른 후 embryonic axis가 붙어

있는 한 쪽을 외과용 메스(#11 blade)로 7·8회 정도 상처를 내었다. 이 때 외과용 메스에 15 mL 농축액을 묻힌 다음 목표 부위에 상처를 내었다. 대략 50개 정도의 절편체를 15 mL co-cultivation/*A. tumefaciens*에 넣고 초음파 분해 처리(sonication)를 20초 처리를 한 뒤 30분 동안 접종시켰다. 각각의 절편체를 튜브에서 꺼내 멸균한 여과지 위에 놓고 물기를 제거한 뒤, 고체 CCM(액체와 동일, Agar 0.7%)에도 여과지를 한 장 깔고 10개체를 올려두었다. 이때 절편체의 향축(adaxial) 부분이 아래로 향하도록 둔다. Micropore로 봉한 뒤 25 °C, 18시간 광주기에 5일 동안 공배양 하였다.

5일간 공배양을 한 후에 제균을 위해서 액체 1/2 SIM(신초 유도 배지)에 10분 동안 간단히 세척하였다. 각각의 절편체를 여과지 위에 놓고 물기를 제거한 뒤 선발항생제가 없는 SI-①(shoot induction medium; B5 salt 3.2 g/L, BA 1.67 mg/L, MES 3 mM, Agar 0.8%, Sucrose 3%, Cefotaxime 250 mg/L, Vancomycin 50 mg/L, Ticarcillin 100 mg/L, pH 5.6)에 한 플레이트(plate)당 6개체씩 배축 부분이 배지에 고착되고 재분화 될 부분이 30° 정도의 각도로 위로 향하도록 치상하였다. 각각의 플레이트를 micropore로 봉한 뒤 25 °C, 18시간 광주기에서 배양시켰다.

2주 후 신초가 나온 절편체를 선발항생제 PPT 10 mg /L가 들어있는 SI-②(SI-①과 동일, DL-phosphinothricin 10 mg/L 첨가, pH 5.6)에 치상하였는데, 이때 신초를 제외한 나머지 부분은 잘라버리고 향축(adaxial) 부분이 밑으로 향하도록 치상하였다.

2주 후 갈변한 신초/신초 pad는 외과용 메스(#15 blade)로 깎아 선발항생제 PPT 5 mg /L가 들어있는 SEM(shoot elongation medium, 신초 신장 배지; MS salt 4.4 g/L, MES 3 mM, GA₃ 0.5 mg/L, Asparagine 50 mg/L, Pyroglutamic acid 100 mg/L, IAA 0.1 mg/L, Zeatin 1 mg /L, Sucrose 3%, Agar 0.8%, Cefotaxime 250 mg/L, Vancomycin 50 mg/L, Ticarcillin 100 mg /L, DL-phosphinothricin 5 mg/L, pH 5.6)에 치상하였다. 2주마다 새로운 SEM으로 옮겨주면서 신초의 갈변부위는 외과용 메스(#15 blade) 윗면으로 쳐서 제거하고 신초 pad는 조금씩 계속 깎아내어 배지가 잘 흡수되도록 하였다.

SEM에서 선발을 거치면서 신장된 신초가 4 cm 이상 일 때, 외과용 메스(#11 blade)로 잘라 RM (rooting medium, 뿌리 유도 배지; MS salt 4.4 g/L, MES 3 mM, Sucrose 3%, Agar 0.8%, Cefotaxime 50 mg/L, Vancomycin 50 mg/L, Ticarcillin 50 mg/L, Asparagine 25 mg/L, Pyroglutamic acid 25 mg/L, pH 5.6)으로 옮겨왔다. 이 때 잘라서 분리해낸 신장된 신초의 밑 부분을 1 mg/mL 농도의 IBA에 3분 동안 담가뒀다가 빼내어 RM이 들어있는 테스트 튜브에 넣었다.

뿌리가 충분히 자라게 되면 3차 증류수로 배지를 씻어내고 상토(바이오 프러그 2호, 흥농종묘)와 버미큘라이트를 2 : 1로 섞어 넣은 작은 포트(6 cm × 6 cm × 5.6 cm)에 심어서 마젠타 상자(Magenta box) 안에 넣었다. 10일 정도 경과 후 잎 표면에 100 mg/L DL-phosphinothricin 로 leaf painting을 하였다.

식물체가 충분히 자라게 되면 더 큰 포트(pot)로 옮겨 심고 투명한 플라스틱 덮개에 10개 정도의 구멍을 만들어 씌웠다. 10일 후 식물체에 basta(BAYER사, 53 mg/L) 처리를 하였다. 그

결과, 비형질전환체 (광안콩, NT)는 민감하게 반응하여 고사한 반면, 형질전환체는 아무런 변화가 없었으며 저항성을 나타내었다. 이후 저항성을 나타내는 콩 형질전환체를 온실로 옮겨 T₁ 종자를 수확하였다. 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석을 위한 primer 정보는 표 13과 같다. 기확보 유전자 도입 형질전환체 생산에 대한 세부 연구 내용은 아래에서 제시하였다.

표 13. 형질전환체의 *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG6*, *ATPG7*, *ATPG8*, *ATPG10*, *MtATPG1*, 그리고 *MtATPG2* 유전자 도입 및 발현 확인을 위해 사용한 primer sequence

Primer name	Primer sequence	Remark
ATPG3 forward	5'- ATGGCAAACCTTGGTGGACGAAC -3'	PCR/RT-PCR
reverse	5'- TCAGTAAGGTGGTCTTGCGTGGAC -3'	PCR/RT-PCR
ATPG4 forward	5'- ATGGCGAATCCATGGTGGACAGGA -3'	PCR/RT-PCR
reverse	5'- TTAATAATCCTGACCTAGCTTGAGC -3'	PCR/RT-PCR
ATPG7 forward	5'- ATGGATCCAGTACAATCTCATGGA -3'	PCR/RT-PCR
reverse	5'- TCAATACGGTGGTCGTCCTCCGTTGA -3'	PCR/RT-PCR
ATPG8 forward	5'- ATGGATGAGGTATCTCGTTCTCAT -3'	PCR/RT-PCR
reverse	5'- AATCTTTCTGCCAGCAACGCAAGG -3'	PCR/RT-PCR
ATPG6 forward	5'- ATGGATCAGGTCTCTCGCTCTCTT -3'	PCR/RT-PCR
reverse	5'- TTAGAAAGATGGTCTCGGAGTCC -3'	PCR/RT-PCR
ATPG10 forward	5'- ATGAAAGGTGAATACAGAGAGCAA -3'	PCR/RT-PCR
reverse	5'- TTAGTATGGCGGTGGAGCTCTGGC -3'	PCR/RT-PCR
MtATPG1 forward	5'- ATGCAAAACATCCACAGGCAAAAC -3'	PCR/RT-PCR
reverse	5'- TCAAAAAGTTGACGTGAAGCTGA -3'	PCR/RT-PCR
MtATPG2 forward	5'- ATGGATGGGAGAGAGGCTATGGCA -3'	PCR/RT-PCR
reverse	5'- TCATCCTCTTGCAAGTCAAAGCC -3'	PCR/RT-PCR
Bar forward	5'- TCCGTACCGAGCCGCAGGAA -3'	PCR
reverse	5'- CCGGCAGGCTGAAGTCCAGC -3'	PCR
LB forward	5'- TGGCTGGTGGCAGGATATATTGTG -3'	PCR
Bar reverse	5'- AGACAAGCACGGTCAACTCCGTA -3'	PCR
Bar forward	5'- AACTTCCGTACCGAGCCGCA -3'	qRT-PCR
reverse	5'- TCGTAGGCGTTGCGTGCCTT -3'	qRT-PCR

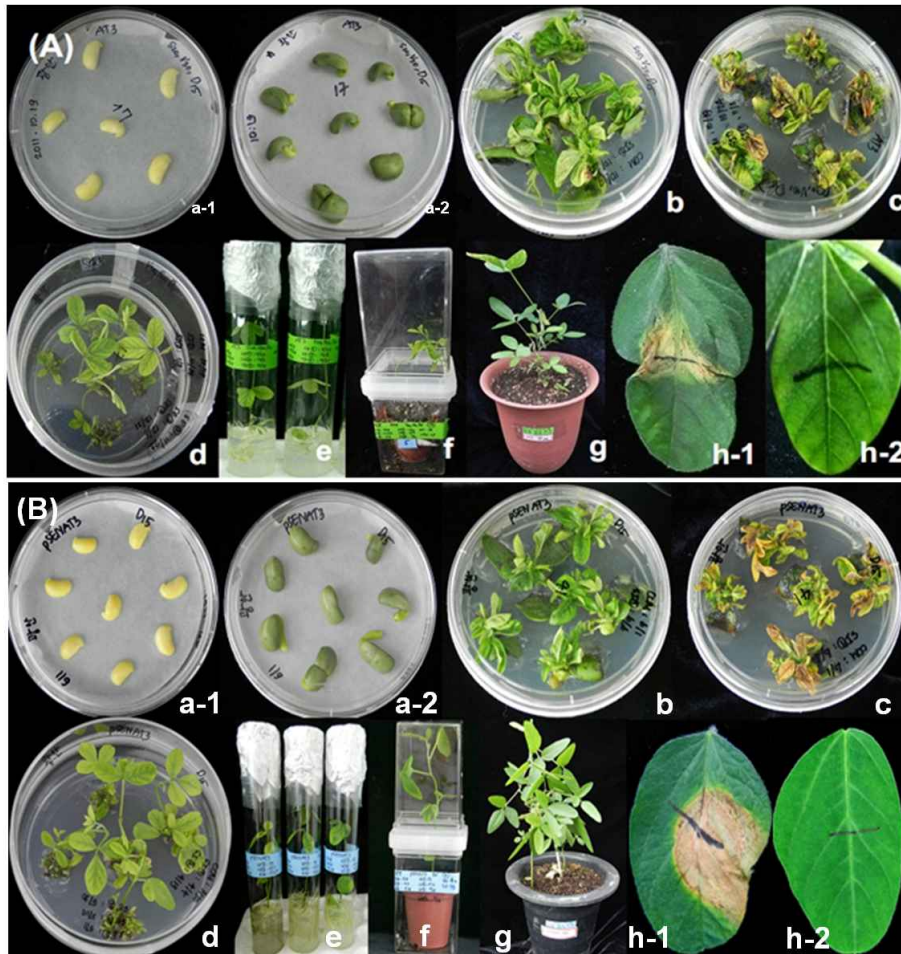


그림 50. pB2GW7.0-ATPG3(A)와 pCSEN-ATPG3(B) 벡터를 이용한 콩 형질전환체 생산 과정. (a) Half seed explants on CCM, 1-after infection, 2-after 5 days inoculation, (b) Shoot induction medium without PPT, (c) Shoot induction medium containing PPT 10 mg/L for bar selection, (d) Shoot elongation medium containing PPT 5 mg/L, (e) Rooting, (f) Acclimated putative transgenic plant in a small pot, (g) transgenic plants in a big pot, and (h) PPT leaf painting, 1-non-transgenic plant (sensitive), 2-transgenic plant (resistance).

① **ATPG3-soybean:** 우리는 두 종류의 벡터, pB2GW7.0-ATPG3과 pCSEN-ATPG3 벡터를 상기의 고효율 콩 형질전환 시스템에 적용하여 콩 형질전환 및 형질전환체 생산을 수행하였다. 이러한 pB2GW7.0-ATPG3과 pCSEN-ATPG3 벡터에 대한 콩 형질전환체 생산의 단계별 결과에 대한 그림은 그림 50에 제시하였다. 콩 형질전환체를 생산하기 위해 접종을 수행하여 공배양을 하였고 신초를 유도하였다. 신초를 신장시킨 후 뿌리를 유도하였고 흙에서의 순환과정을 거쳐 T₀ 형질전환체를 생산하였다. 이러한 과정을 통하여 현재까지 pB2GW7.0-ATPG3 벡터 적용의 경우, 3개체의 형질전환 식물, 그리고 pCSEN-ATPG3 벡터 적용의 경우도 3개체의 형질전환 식물을 생산하여, ATPG3 유전자에 대하여 총 6종의 형질전환체를 생산하였다.

생산된 T₀ 식물체가 형질전환체인지를 확인하기 위하여 우리는 선별 마커 유전자 *BAR*의 발현으로 인한 PPT 저항성을 가지는지를 식물체의 잎에 PPT painting assay를 수행하였다. 그 결과, 비형질전환체의 잎은 고사하였고, pB2GW7.0-ATPG3과 pCSEN-ATPG3 형질전환체의 잎에서는 PPT에 대한 저항성을 보였다. 이와 같이 PPT 저항성을 가지는 3개체의

pB2GW7.0-ATPG3과 3개체의 pCSEN-ATPG3 콩 형질전환체의 표현형은 그림 51A에, 그리고 형질전환체로부터 수확한 T₁ 형질전환 종자의 수는 그림 51B에 제시하였다.

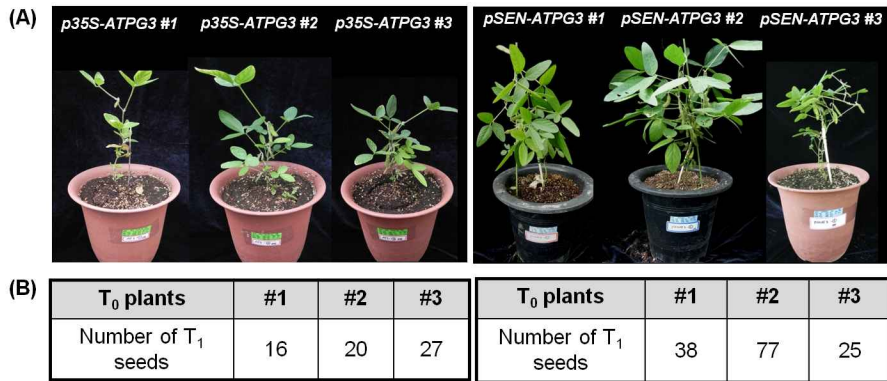


그림 51. pB2GW7.0-ATPG3과 pCSEN-ATPG3 벡터를 도입한 콩 형질전환체의 표현형(A) 및 형질전환체로부터 수확된 T₁ 형질전환 종자 수(B). p35S-: pB2GW7.0-, pSEN-: pCSEN-.

생산된 형질전환체에 대한 유전자 도입 및 발현을 확인하기 위하여 도입 벡터의 선별 유전자 *BAR*와 도입 유전자 *ATPG3*을 대상으로 PCR과 RT-PCR을 수행하였다. 형질전환 식물체의 잎을 1 g 정량한 후 액체질소로 얼리고 막자사발에 얼린 잎을 넣고 곱게 갈아 준 후, CTAB 방법을 이용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 도입 유전자인 *ATPG3*과 선발항생제 유전자인 *BAR*의 염기서열을 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, pB2GW7.0-ATPG3 3개체와 pCSEN-ATPG3 3개체의 형질전환체 모두에서 *ATPG3*과 *BAR* 유전자가 모두 도입되었음을 확인하였다. 또한, 삽입 벡터의 left border 및 right border 부분을 PCR을 이용하여 증폭한 결과 벡터의 T-DNA의 삽입이 손상없이 완벽하게 이루어졌음을 확인하였다(그림 52A).

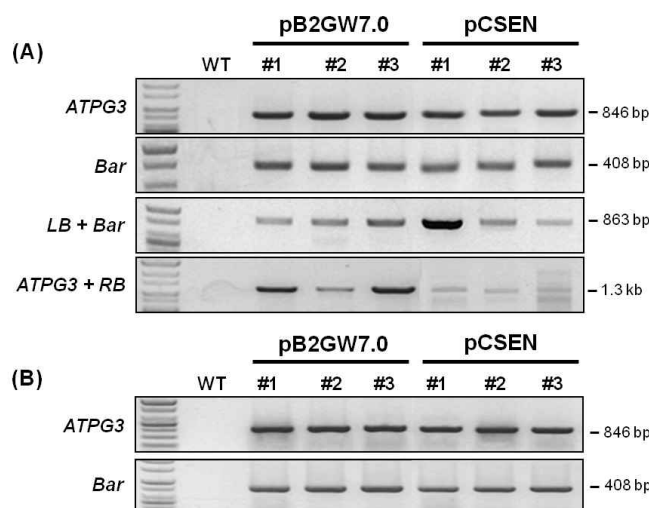


그림 52. PCR과 RT-PCR을 통한 pB2GW7.0-ATPG3과 pCSEN-ATPG3 콩 형질전환체의 유전자 도입(A) 및 유전자 발현(B) 확인. pB2GW7.0: pB2GW7.0-ATPG3, pCSEN: pCSEN-ATPG3.

형질전환체로부터 삽입 유전자의 발현을 확인하기 위하여 형질전환 식물체의 잎을 Plant RNA Purification Reagent(invitrogen)를 이용하여 RNA를 분리하였으며, 도입 유전자인 *ATPG3*과 선발항생제 유전자인 *BAR*의 염기서열을 이용하여 RT-PCR를 수행하였다. 그 결과, pB2GW7.0-*ATPG3*과 pCSEN-*ATPG3* 형질전환체 모두에서 *ATPG3*과 *BAR* 유전자가 모두 발현되었음을 확인하였다(그림 52B). 형질전환체 생산에 적용된 *ATPG3* 유전자는 유전자의 발현 정도에 따라 다수성 형질 및 녹기연장의 형질을 제공하므로 이러한 유전자 발현 연구는 추후 형질전환체의 목적형질 및 다수성에 대한 농업형질을 분석하는데 있어서 매우 중요한 역할을 담당할 것이다.

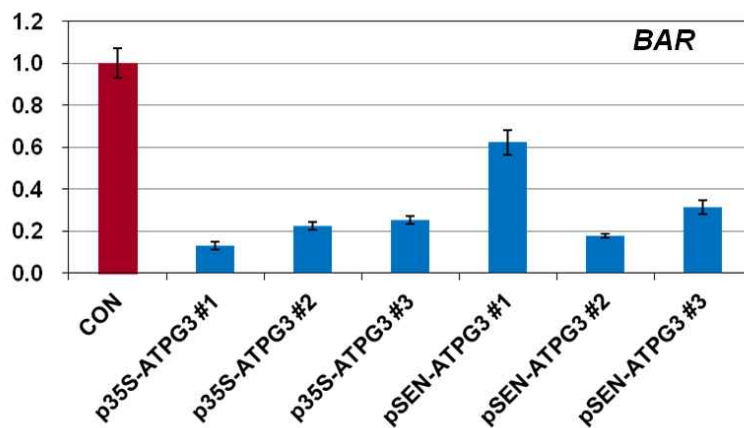


그림 53. 형질전환체의 잠정 copy 수 확인을 위하여 수행된 qRT-PCR을 통한 pB2GW7.0-*ATPG3*과 pCSEN-*ATPG3* 콩 형질전환체의 *BAR* 유전자 발현 비교, CON, 1 copy clean 콩 형질전환체; p35S-: pB2GW7.0-, pSEN-: pCSEN-.

표 14. pB2GW7.0-*ATPG3* 벡터를 이용한 형질전환체의 1차 농업적 특성 분석. p35S-: pB2GW7.0-.

ATPG3 line	기장 (cm)	분지 (개)	마디 (개)	혈수 (개)	백립중 (g)	총중량 (g)
광안콩 (5 개체수 평균)	49.6	8	16	230	14.9	65
p35S ATPG3-1-1	47	7	16	200	15.1	53
p35S ATPG3-1-2	50	9	15	195	16.6	51
p35S ATPG3-1-3	38	10	13	105	16.3	33.2
p35S ATPG3-1-4	44	7	15	179	17.2	48.9
p35S ATPG3-1-5	50	6	16	145	15.8	39
p35S ATPG3-1-6	48	11	15	205	16.9	45
p35S ATPG3-1-7	45	5	14	210	16.1	59.2
p35S ATPG3-2-1	52	6	17	237	15.2	61.6
p35S ATPG3-2-2	57	6	16	260	15.8	92.2
p35S ATPG3-3-1	20	5	8	55	14.9	16.6
p35S ATPG3-3-2	25	5	7	70	11.3	20.4
p35S ATPG3-3-3	19	7	5	64	10.6	14.2
p35S ATPG3-3-4	24	8	11	145	15.2	42.9
p35S ATPG3-3-5	23	6	8	98	13.6	27.4
p35S ATPG3-3-6	31	9	11	155	16.8	43.9

한편, 도입 유전자의 copy 수를 확인하기 위하여 우리는 형질전환 식물체를 대상으로 *BAR* 유전자의 발현 정도를 조사하였다. 이러한 *BAR* 유전자의 발현 정도는 확보하고 있는 1 copy 형질전환체의 *BAR* 유전자 발현을 control로 사용하여 이에 대한 상대 값으로 확인하였다. 그 결과, 생산된 6종의 형질전환체 모두 control보다 낮은 발현량을 가졌다(그림 53). 이와

같은 사실은 6종의 형질전환체 모두가 잠정 1 copy 형질전환체일 것으로 생각된다. 이러한 잠정 1 copy 형질전환체는 추후 T₁ 형질전환 식물체에서 서던 분석을 통하여 copy 수에 대한 최종 확인할 것이다. 우리는 보다 많은 *ATPG3* 도입 형질전환체를 확보하기 위하여 형질전환 및 형질전환체 생산 과정을 계속 수행하고 있다.

표 15. pCSEN-ATPG3 벡터를 이용한 형질전환체의 1차 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-.

ATPG3 line	기장 (cm)	분지 (개)	마디 (개)	협수 (개)	백립중 (g)	총중량 (g)
광안콩 (5 개체수 평균)	49.6	8	16	230	14.9	65
pSEN ATPG3-1-1	57	5	16	275	17.8	80.1
pSEN ATPG3-1-2	55	7	19	244	14.8	55.2
pSEN ATPG3-1-3	47	8	15	210	18	42.1
pSEN ATPG3-1-4	57	6	18	285	17	55.6
pSEN ATPG3-1-5	50	6	16	213	16.1	43.7
pSEN ATPG3-1-6	49	11	18	316	17.2	94.7
pSEN ATPG3-2-1	32	7	10	186	14.6	53.2
pSEN ATPG3-3-1	55	5	15	160	13.1	47.2
pSEN ATPG3-3-2	55	5	15	220	16.9	44.2
pSEN ATPG3-3-3	60	6	18	204	15.7	50.2
pSEN ATPG3-3-4	60	6	19	208	13.9	39
pSEN ATPG3-3-5	41	4	11	56	.	5.8
pSEN ATPG3-3-6	36	7	13	133	16.9	24.8
pSEN ATPG3-3-7	49	9	17	278	14.2	72

생산된 T₁ 식물체에 대하여 GMO 포장에서 1차 농업형질 분석을 수행하기 위해 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₂ 종자를 수확하였다. pB2GW7.0-ATPG3 벡터를 적용한 콩 형질전환체의 3 라인으로부터 1차 농업형질을 조사한 결과, line 1과 3 형질전환체에서는 다양한 표현형 변이를 보였는데 경장, 분지수, 마디수, 협수, 백립중 및 총중량은 wild type인 광안콩과 비슷한 경향을 보이거나 개체당 수량이 현저하게 떨어졌다. 그러나 line 2의 형질전환체의 경우에는 백립중 및 총중량이 광안콩과 비슷하거나 수량이 높게 나타났다(표 14). 개체당 수량이 떨어진 식물체들은 도복이 되었으며 심한 바이러스 증상과 비슷한 오갈증으로 인해 발생되었다고 판단되어 진다. pCSEN-ATPG3 벡터를 적용한 콩 형질전환체 3 라인의 경장, 분지수, 마디수, 협수, 백립중 및 총중량도 마찬가지로 다양한 표현형 변이를 보였다. Line 1-1과 1-6에서는 백립중 및 총중량이 광안콩 보다 수량이 높았으며, line 3-7의 백립중은 광안콩과 비슷하였고 총중량은 높게 나타났다(표 15). GMO 포장에서의 1차 농업형질에 대한 조사를 토대로 우리는 pB2GW7.0-ATPG3-2-2와 pCSEN-ATPG3-1-6을 다수성에 대한 우수한 라인으로 선별하였다.

생산된 T₂ 식물체에 대하여 GMO 포장에서 2차 농업형질 분석을 수행하기 위해 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, wild type인 광안콩과 비슷하거나 상대적으로 우수한 형질을 보이는 T₃ 종자를 수확하였다. 2차 농업형질 분석에 있어서 광안콩 야생형의 농업형질은 표 14와 같다. pB2GW7.0-ATPG3 벡터를 적용한 콩 형질전환체의 5라인으로부터 2차 농업형질을 조사한 결과, 다양한 표현형 변이를 보였는데 경장, 분지수, 마디수, 협수 및 총중량은 wild type인 광안콩과 비슷한 경향을 보이거나 낮았으나, 백립중의 경우 전체적으로 높게 나타났다(표 17). 개체당 수량이 떨어진 식물체들은 도복이 되었으며 심한

바이러스 증상과 비슷한 오갈증으로 인해 발생되었다고 판단되어 진다. pCSEN-ATPG3 벡터를 적용한 콩 형질전환체 6라인의 경장, 분지수, 마디수, 협수, 백립중 및 총중량도 마찬가지로 다양한 표현형 변이를 보였다. 전체적으로 백립중은 wild type에 비해 작았으나 Line 1-1과 1-4, 1-6에서는 수량 및 총중량이 광안콩 야생종보다 높았으며, line #3의 수량 및 총 중량은 광안콩과 비슷하거나 낮게 나타난 것을 확인하였다(표 18). GMO 포장에서의 2차 농업형질에 대한 조사를 토대로 우리는 pB2GW7.0-ATPG3 1-1-1, 1-7-2, 2-1-4, 2-2-4와 pCSEN-ATPG3 1-1-3, 1-4-1, 3-1-1, 3-7-4을 다수성에 대한 우수한 라인으로 선별하였다.

표 16. 농업적 특성 분석(2015년, 군위)에 있어서 광안콩 야생형의 농업적 특성

2015년 군위 수확 조사 -광안콩(WT)							
	기장	분지수	마디수	협수	총 종자	종자 무게	백립중
WT #1	70	7	16	77	133	17.56	13.20
WT #2	65	8	16	183	453	58.58	12.93
WT #3	71	8	17	147	212	40.69	19.19
WT #4	61	7	14	88	181	24.02	13.27
WT #5	65	9	16	320	415	54.11	13.04
WT #6	63	9	13	247	349	45.7	13.09
WT #7	67	7	17	120	212	27.74	13.08
WT #8	72	9	22	223	320	41.93	13.10
WT #9	71	9	18	260	516	63.91	12.39
WT #10	55	7	12	157	224	28.81	12.86
WT #11	55	8	14	200	339	45.5	13.42
WT #12	54	7	16	176	234	30.52	13.04
~~~~~							
WT #41	53	6	17	197	416	88.8	21.35
WT #42	59	7	15	146	238	33.03	13.88
WT #43	53	6	14	152	305	39.68	13.01
WT #44	61	6	16	117	363	49.84	13.73
WT #45	56	8	15	260	367	51.78	14.11
WT #46	57	7	16	196	247	37.58	15.21
WT #47	56	8	17	163	315	40.82	12.96
WT #48	60	7	15	31	191	24.53	12.84
WT #49	53	8	14	160	233	31.07	13.33
WT #50	60	10	16	258	477	67.76	14.21
평균	56.68	8.50	15.30	195.80	283.48	39.66	14.14

표 17. pB2GW7.0-ATPG3 벡터를 이용한 형질전환체의 2차 농업적 특성 분석. p35S-: pB2GW7.0-

2015년도 군위 수확 -p35S-AT3								#2-1-1	40	5	11	138	247	37.6	15.22
결찰	분지수	마디수	협수	총 종자	종자 무게	백립중		#2-1-2	52	3	17	96	166	18.21	10.97
#1-1-1	60	8	14	212	436	61.17	14.03	#2-1-3	52	4	15	55	83	10.06	12.12
#1-1-2	52	6	15	155	281	39.67	14.12	#2-1-4	47	6	16	160	305	45.96	15.07
#1-1-3	42	5	10	123	282	44.35	15.73	#2-1-5	54	3	16	68	127	21.26	16.74
#1-1-4	56	8	15	149	297	40.99	13.80	#2-1-6	54	2	16	79	153	26.61	17.39
평균	52.50	6.75	13.50	159.75	324.00	46.55	14.42	#2-1-7	50	4	16	92	117	17.38	14.85
#1-2-1	42	5	11	133	233	32.65	14.01	#2-1-8	52	5	15	128	268	42.06	15.69
#1-2-2	41	7	14	112	270	40.14	14.87	#2-1-9	47	1	15	38	58	5.99	10.33
#1-2-3	47	4	15	102	191	28.72	15.04	#2-1-10	34	5	13	84	104	14.66	14.10
평균	43.33	5.33	13.33	115.67	231.33	33.84	14.64	평균	48.20	3.80	15.00	93.80	162.80	23.98	14.25
#1-7-1	48	2	14	63	127	17.19	13.54	#2-2-1	47	1	16	98	191	16.13	8.45
#1-7-2	52	7	16	207	343	52.13	15.20	#2-2-2	53	2	15	103	178	28.49	16.01
#1-7-3	58	6	14	169	135	20.37	15.09	#2-2-3	46	7	15	148	275	31.55	11.47
#1-7-4	35	5	11	133	44	5.55	12.61	#2-2-4	55	3	16	92	179	28.13	15.72
#1-7-5	42	5	12	69	87	12.37	14.22	#2-2-5	42	1	14	80	160	23.14	14.46
#1-7-6	53	5	12	133	159	24.6	15.47	#2-2-6	42	5	13	148	204	31.72	15.55
#1-7-7	50	4	14	90	178	27.98	15.72	#2-2-7	51	1	17	110	222	26.76	12.05
평균	48.29	4.86	13.29	123.43	153.29	22.88	14.55	#2-2-8	48	2	15	111	114	32.38	28.40
								#2-2-9	40	0	12	33	44	6.07	13.80
								평균	47.11	2.44	14.78	102.56	174.11	24.93	15.10
								총평균	48.00	4.15	14.24	112.45	189.64	27.64	14.60

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 16 참조(n=50).

표 18. pCSEN-ATPG3 벡터를 이용한 형질전환체의 2차 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-

2015년도 군위 수확 -pSEN-AT3								#3-1-1	#3-1-2	#3-1-3	#3-1-4	#3-1-5	#3-1-6	#3-1-7	#3-1-8	#3-1-9	평균		
	경장	분지수	마디수	형수	총 중량	중량 무게	백질중												
#1-1-1	48	6	16	293	349	63.67	18.24	56	3	14	149	325	44.29	13.63					
#1-1-2	49	4	12	19	478	58.19	12.17	44	3	14	123	277	25.08	9.05					
#1-1-3	59	6	18	225	524	72.55	13.85	57	4	14	117	190	27.17	14.30					
#1-1-4	62	7	17	321	656	85.68	13.06	51	1	14	66	100	14.38	14.38					
#1-1-5	39	3	13	74	170	16.9	9.94	58	7	19	194	426	54.22	12.73					
#1-1-6	51	7	15	254	375	58.65	15.64	50	5	17	173	276	40.06	14.51					
평균	51.33	5.50	15.17	197.67	425.33	59.27	13.82	54	2	15	127	201	28.3	14.08					
#1-4-1	54	8	17	275	575	82.03	14.27	56	5	18	167	274	36.64	13.37					
#1-4-2	43	1	13	77	158	16.2	10.25	51	3	13	172	245	32.06	13.09					
#1-4-3	44	2	14	94	233	21	9.01	52.89	3.67	15.33	143.11	257.11	33.58	13.24					
#1-4-4	42	2	13	196	320	46.3	14.47	#3-3-1	58	4	18	327	718	95.33	13.28				
#1-4-5	51	6	15	186	249	49.69	19.95	#3-3-2	44	1	13	131	240	36.1	15.04				
#1-4-6	58	5	16	240	340	42.34	12.45	#3-3-3	55	3	15	98	133	21.34	16.05				
#1-4-7	40	5	13	142	295	40.2	13.63	#3-3-4	65	3	16	98	169	24.2	14.32				
#1-4-8	47	4	15	179	415	54.79	13.20	#3-3-5	52	2	14	187	74	12.14	16.41				
평균	47.38	4.13	14.50	173.63	323.13	44.07	13.40	#3-3-6	65	4	19	183	293	36.05	12.30				
#1-6-1	46	1	14	90	154	20.69	13.44	#3-3-7	57	4	17	178	291	44.17	15.18				
#1-6-2	51	5	14	239	455	57.89	12.68	평균	56.57	3.00	16.00	171.71	274.00	38.48	14.65				
#1-6-3	62	3	16	196	474	59.75	12.61	#3-7-1	48	1	14	69	102	14.52	14.24				
#1-6-4	53	3	16	160	393	52.12	13.26	#3-7-2	59	3	15	156	234	35.34	15.10				
#1-6-5	52	4	15	201	372	46.46	12.49	#3-7-3	48	1	12	104	204	26.27	12.88				
#1-6-6	50	5	16	163	342	53.75	15.72	#3-7-4	53	3	15	154	292	50.45	17.28				
#1-6-7	42	1	15	55	99	9.93	10.03	#3-7-5	50	4	16	118	201	29.93	14.89				
#1-6-8	35	3	14	101	225	21.86	9.72	#3-7-6	42	2	13	93	176	23.37	13.28				
#1-6-9	50	3	16	181	293	40.64	13.67	평균	50.00	2.33	14.17	117.33	201.50	29.98	14.61				
평균	49.00	3.11	15.11	154.00	311.89	40.32	12.65	총평균	51.11	3.60	15.07	159.00	297.44	40.50	13.63				

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 16 참조(n=50).

우리는 1, 2차 농업형질 분석 결과를 토대로 GMO 포장에서 추가 파종을 실시하여 이벤트 후보로서의 형질을 가지는 지를 확인하였다.

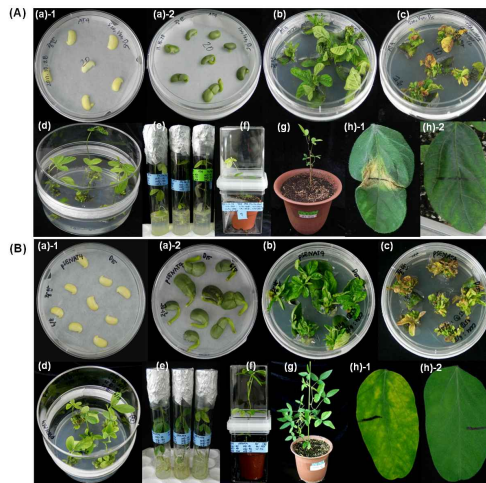


그림 54. pB2GW7.0-ATPG4(A)와 pCSEN-ATPG4(B) 벡터를 도입한 콩 형질전환체 생산 과정. (a) Half seed explants on CCM, 1-after infection, 2-after 5 days inoculation, (b) Shoot induction medium without PPT, (c) Shoot induction medium containing PPT 10 mg/L for bar selection, (d) Shoot elongation medium containing PPT 5 mg/L, (e) Rooting, (f) Acclimated putative transgenic plant in a small pot, (g) transgenic plants in a big pot, and (h) PPT leaf painting, 1-non-transgenic plant (sensitive), 2-transgenic plant (resistance).

② ATPG4-soybean: 우리는 두 종류의 벡터, pB2GW7.0-ATPG4와 pCSEN-ATPG4 벡터를 상기의 고효율 콩 형질전환 시스템에 적용하여 콩 형질전환 및 T₀ 형질전환체를 생산하였다. 이러한 pB2GW7.0-ATPG4와 pCSEN-ATPG4 벡터에 대한 콩 형질전환체 생산의 단계별 결과에 대한 그림은 그림 54에 제시하였다. 콩 형질전환체를 생산하기 위해 접종을 수행하여 공배양을



하였고 신초를 유도하였다. 신초를 신장시킨 후 뿌리를 유도하였고 흙에서의 순환과정을 거쳐  $T_0$  형질전환체를 생산하였다. 이러한 과정을 통하여 현재까지 pB2GW7.0-ATPG4 벡터 적용의 경우, 24개체의 형질전환 식물, 그리고 pCSEN-ATPG4 벡터 적용의 경우도 4개체의 형질전환 식물을 생산하여, *ATPG4* 유전자에 대하여 총 28종의 형질전환체를 확보하였다(그림 55). pB2GW7.0-ATPG4와 pCSEN-ATPG4의  $T_0$  식물체가 형질전환체임을 확인하기 위하여 일차적으로 선별 마커 유전자 *BAR*의 발현을 통해 PPT 저항성을 가지는 지를 스몰 포트(small pot) 순환과정에 있는 식물체의 앞에서 PPT painting assay를 수행하였다. 그 결과, 비형질전환체의 잎은 고사하였고, pB2GW7.0-ATPG4와 pCSEN-ATPG4 도입 식물체의 잎에서는 PPT에 대한 저항성을 보여 일차적으로 형질전환체임을 확인하였다. 그러나 처음 생산된 형질전환체는 온실에서 발생한 병충해에 대한 피해로 인해 식물체들이 모두 고사하여 재접종을 실시하여 28개의 1차 선발을 거친 형질전환체를 확보하였으며, 3차년도에 포장검정을 통하여 line을 선발하여 2차 파종 후  $T_3$  종자를 수확하였다. pCSEN-ATPG4의 경우 Basta 처리를 실시하여 1, 2, 3 line은 전부 고사하였고 line 4-1 개체만 수확할 수 있었다.

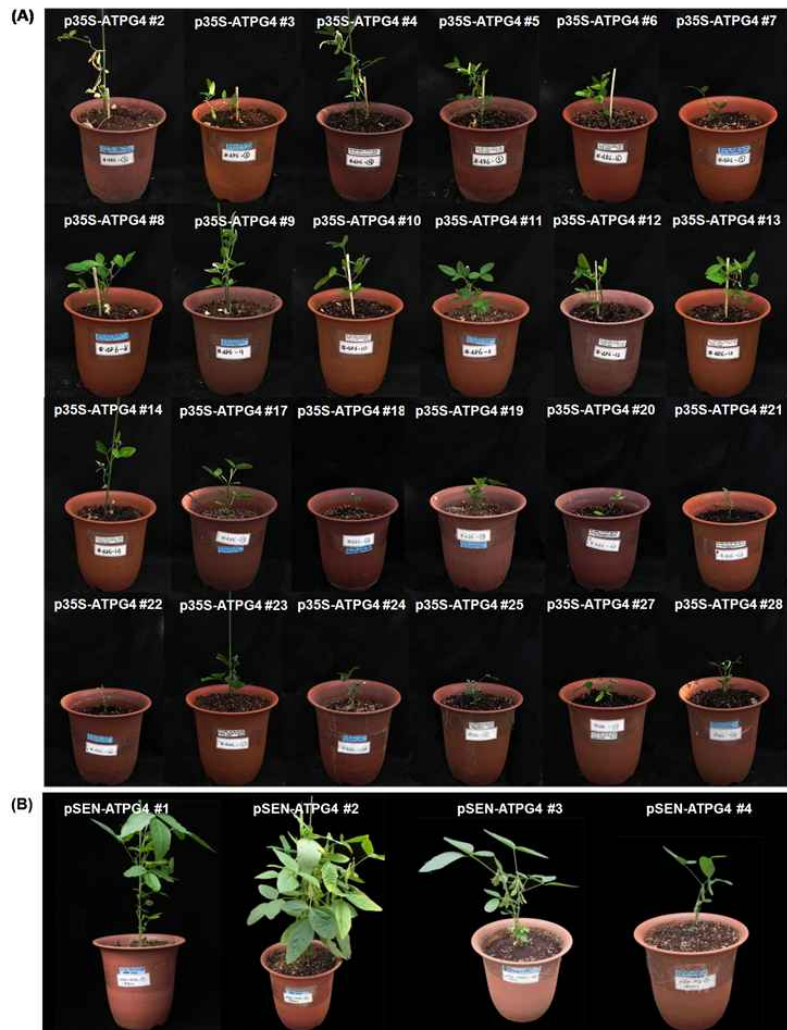


그림 55. pB2GW7.0-ATPG4(A)와 pCSEN-ATPG4(B) 벡터를 도입한 콩 형질전환체의 표현형. p35S-: pB2GW7.0-, pSEN-: pCSEN-.

표 19. pB2GW7.0-ATPG4 벡터를 이용한 형질전환체의 1차 농업적 특성 분석. p35S-: pB2GW7.0-.

p35S-ATPG4							p35S-ATPG4							p35S-ATPG4						
#	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	백립중(g)	총중량(g)	#	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	백립중(g)	총중량(g)	#	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	백립중(g)	총중량(g)
# 1-1	53	6	11	165	14.52899	40.1	# 8-2	49	6	13	212	12.4119	52.13	# 14-1	58	7	14	183	13.45269	52.6
# 1-2	50	8	11	222	13.03608	50.58	# 8-3	47	4	11	211	17.39085	49.39	# 14-2	59	8	14	86	13.31321	35.28
# 1-3	52	7	13	192	14.22712	41.97	# 8-4	49	6	11	243	14.54545	49.6	# 14-3	63	7	13	99	12.62468	49.11
# 1-4	58	5	13	198	14.16487	39.52	# 9-1	72	7	13	101	14.16316	66.17	# 14-4	61	8	14	134	13.23226	61.53
# 1-5	57	7	11	178	13.69583	32.87	# 9-2	68	7	14	81	13.29076	48.91	# 15-1	68	7	14	126	13.61631	56.78
# 1-6	50	8	12	247	14.20879	51.72	# 10-1	58	7	14	72	13.56835	37.72	# 15-2	35	6	12	172	11.46111	20.63
# 4-1	52	5	14	202	14.50365	39.74	# 10-2	73	7	13	89	11.33649	23.92	# 15-3	47	6	13	129	11.48344	17.34
# 4-2	50	6	10	57	10.93878	10.72	# 10-3	65	7	15	106	12.86016	48.74	# 15-4	42	4	13	76	10.74016	13.64
# 4-3	45	6	11	171	24.25	29.1	# 10-4	68	8	13	94	13.41275	39.97	# 15-5	53	7	14	272	13.72791	59.03
# 4-4	40	6	13	31	0	4	# 10-5	56	6	13	72	13.30455	29.27	# 16-1	47	5	12	196	14.07229	46.72
# 4-5	61	7	14	177	13.82273	30.41	# 10-6	63	6	14	118	13.82301	46.86	# 16-2	45	5	10	214	14.89256	54.06
# 4-6	53	7	13	153	13.73944	19.51	# 11-1	58	7	15	121	14.21774	52.89	# 17-1	44	5	10	179	13.62189	54.76
# 4-7	57	5	13	94	11.61702	16.38	# 11-2	79	7	13	72	12.44444	22.4	# 17-2	42	7	14	179	13.14485	47.19
# 4-8	52	6	15	109	11.44203	15.79	# 11-3	81	8	15	68	13.47	26.94	# 17-3	33	5	12	103	12.45378	14.82
# 5-1	53	7	10	222	14.5098	59.2	# 11-4	58	7	13	89	13.59133	43.9	# 19-1	34	5	7	121	10.71176	18.21
# 5-2	51	7	13	164	7.567164	25.35	# 11-5	56	6	14	91	10.92935	20.11	# 19-2	55	4	11	222	13.35252	55.68
# 5-3	48	6	12	228	14.36476	57.89	# 11-6	71	8	15	116	13.73154	40.92	# 23-1	59	7	14	194	13.30435	42.84
# 5-4	54	6	13	231	13.17778	41.51	# 12-1	72	8	14	120	13.09896	34.45	# 23-2	59	7	15	319	13.65286	69.22
# 5-5	58	6	14	228	14.50962	45.27	# 12-2	76	7	14	184	14.28465	57.71	# 23-3	52	7	12	260	13.78338	54.72
# 6-1	55	6	10	236	14.21483	55.58	# 12-3	78	8	15	152	13.01169	77.94	# 24-1	60	7	15	204	12.73684	38.72
# 7-1	54	6	12	249	14.48889	65.2	# 12-4	79	7	14	132	14.3951	41.17	# 27-1	57	7	16	146	14.36039	44.23
# 7-2	47	6	13	204	12.96552	48.88	# 13-1	74	7	13	88	14.12871	42.81	# 27-2	58	8	15	272	14.72152	58.15
							# 13-2	59	7	14	78	13.84483	32.12	# 28-1	53	7	15	228	14.264	53.49
							# 13-3	61	8	15	80	12.76018	28.2	# 28-2	56	5	12	168	18.86341	38.67
							# 13-4	58	6	13	76	14.3875	23.02	# 28-3	51	7	15	220	15.0241	49.88
							# 13-5	64	7	15	65	13.66901	38.82	# 28-4	54	7	16	190	14.35254	42.34
							# 13-6	63	7	14	65	13.34348	30.69	# 31-1	58	8	13	230	13.09814	49.38
							# 13-7	71	8	14	98	13.42895	50.09	# 31-2	55	7	15	193	12.85315	36.76
														# 31-3	42	6	13	114	12.22013	19.43

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 14 참조(n=5).

생산된 T₁ 식물체에 대하여 GMO 포장에서 1차 농업형질 분석을 수행하기 위해 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₂ 종자를 수확하였다. pB2GW7.0-ATPG4 벡터를 적용한 콩 형질전환체의 24개체로부터 1차 농업형질을 조사한 결과, 전체적으로 다양한 표현형 변이를 보였는데 경장, 분지수, 마디수, 협수, 백립중 및 총중량은 wild type인 광안콩과 비슷한 경향을 보이거나 개체당 수량이 현저하게 떨어졌다. 그러나 line 4, 15, 24, 31을 제외한 나머지 형질전환체의 경우에는 백립중 및 총중량이 광안콩과 비슷하거나 수량이 높게 나타났다(표 19). 개체당 수량이 떨어진 식물체들은 도복이 되었으며 심한 바이러스 증상과 비슷한 오갈증으로 인해 발생되었다고 판단되어 진다. GMO 포장에서의 농업형질에 대한 조사를 토대로 우리는 pB2GW7.0-ATPG4-9-1을 수량이 우수한 line으로 선별하여 GMO 포장에 추가 파종을 실시하였다.

생산된 T₂ 식물체에 대하여 GMO 포장에서 2차 농업형질 분석을 수행하기 위해 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₃ 종자를 수확하였다. pB2GW7.0-ATPG4 벡터를 적용한 콩 형질전환체의 농업형질을 조사한 결과(표 20), 수확량이 너무 많아 각 라인의 평균값만을 표기하였다. 전체적으로 다양한 표현형 변이를 보였는데 경장, 분지수, 마디수, 협수, 백립중 및 총중량은 wild type인 광안콩과 비슷한 경향을 보이거나 개체당 수량이 현저하게 떨어졌다. 그러나 line 1-1, 1-2, 9-1, 9-2, 15-2, 23-1, 23-2이 백립중 및 총중량이 광안콩과 비슷하거나 수량이 높게 나타났다. 개체당 수량이 떨어진 식물체들은 도복이 되었으며 심한 바이러스 증상과 비슷한 오갈증으로 인해 발생되었다고 판단되어 진다. GMO 포장에서의 농업형질에 대한 조사를 토대로 우리는 pB2GW7.0-ATPG4 1-15, 4-1-10, 7-1-10, 8-4-7, 9-2-2, 11-6-7, 12-4-6, 14-4-1, 19-2-1, 23-1-2를 수량이 우수한 line으로 선별하여 GMO 포장에 추가 파종을 실시하였다. 한편 pCSEN-ATPG4 벡터를 적용한 콩 형질전환체의 농업형질을 조사한 결과 Basta assay에서 고사하여 1개체만 선발 되었으나 경장, 분지수 총중량 등 wild type에 비해 현저히 떨어지는 결과를 보여 세대진전 시키지 않았다(표 21).

표 20. pB2GW7.0-ATPG4 벡터를 이용한 형질전환체의 각 라인별 2차 평균 농업적 특성 분석. p35S-: pB2GW7.0-.

2015년도 군위 수확 -p35S-AT4								# 13-5	41.00	3.75	12.25	131.00	218.25	28.43	13.04
	경장	분지수	마디수	형수	총 중량	중량무게	백립중	# 13-7	35.80	4.80	11.00	128.80	203.60	26.82	13.03
# 1-1	58.60	8.10	14.90	202.00	270.80	36.78	13.53	# 14-1	55.30	5.40	14.90	150.40	213.20	28.38	13.50
# 1-2	61.50	9.00	16.20	242.10	317.40	39.13	12.55	# 14-3	64.30	7.30	15.80	162.80	227.30	29.02	12.68
# 1-6	61.60	8.30	16.00	215.70	237.89	33.67	20.46	# 14-4	59.60	7.10	17.10	205.50	197.70	25.42	12.78
# 4-1	60.00	7.60	15.30	175.70	265.40	33.75	12.62	# 15-1	56.40	6.60	16.00	169.00	216.80	27.94	12.84
# 4-3	66.30	7.40	15.70	151.50	221.00	28.36	12.69	# 15-2	53.67	5.89	14.78	123.67	193.44	26.58	18.49
# 4-5	53.60	5.20	15.60	122.10	135.10	18.81	12.07	# 15-5	60.00	7.30	15.90	126.00	201.00	26.86	13.26
# 5-1	64.10	7.60	15.80	157.00	229.20	29.89	13.09	# 16-1	55.00	7.10	15.40	157.30	208.70	27.19	12.89
# 5-3	65.30	8.60	16.80	208.60	222.30	28.27	13.11	# 16-2	54.30	6.50	14.60	136.40	155.30	19.49	12.52
# 5-5	65.30	8.90	16.70	208.10	226.50	28.84	12.74	# 17-1	49.20	6.20	14.40	118.80	194.00	24.38	12.53
# 6-1	64.40	8.50	16.90	239.10	269.30	33.98	12.65	# 17-2	49.67	7.11	14.67	166.00	222.56	30.21	13.45
# 7-1	69.10	8.10	15.10	147.70	241.90	31.89	13.02	# 17-3	51.30	7.20	14.80	127.30	211.40	26.83	12.64
# 7-2	70.90	6.80	15.60	128.20	215.20	28.05	13.02	# 19-1	45.10	6.20	14.00	138.90	238.30	32.23	13.57
# 8-1	68.50	7.90	15.10	154.60	229.90	29.85	13.01	# 19-2	45.00	7.00	12.56	160.22	217.33	30.46	13.81
# 8-3	59.50	6.90	15.40	170.30	220.80	28.32	12.81	# 23-1	49.10	6.60	13.80	138.10	191.20	28.00	14.70
# 8-4	60.90	6.78	15.78	180.11	228.50	29.82	12.98	# 23-2	53.00	6.10	14.80	170.30	231.10	73.01	26.38
# 9-1	65.50	7.30	15.90	194.60	294.40	39.28	14.18	# 23-3	51.10	7.00	14.70	124.40	206.40	27.42	13.25
# 9-2	66.60	8.80	16.80	269.60	331.40	43.22	13.18	#24-1	46.50	9.40	13.60	166.90	235.80	31.83	13.46
#10-3	59.30	7.90	15.30	219.90	264.80	33.45	12.81	# 27-1	50.40	7.20	14.30	156.20	174.90	23.01	13.23
#10-4	65.10	7.10	16.30	156.50	256.90	33.34	13.13	# 27-2	50.30	7.30	14.80	175.70	173.10	22.09	12.78
#10-6	62.70	7.90	16.40	203.40	222.40	29.08	13.01	# 28-1	47.00	7.50	14.40	150.60	197.40	25.37	12.83
# 11-1	69.30	8.10	15.80	162.70	256.00	32.22	12.82	# 28-3	48.60	8.70	14.50	175.10	208.00	25.10	12.20
# 11-4	59.60	8.70	16.00	207.60	295.60	35.18	11.77	# 28-4	46.70	6.90	14.70	160.00	180.90	23.75	13.10
# 11-6	60.50	8.20	16.40	226.90	275.50	36.21	13.16	# 31-1	46.50	6.80	14.40	153.00	161.20	21.55	13.43
# 12-2	58.40	6.80	15.20	150.60	237.00	30.76	12.91	# 31-2	43.60	7.00	13.70	160.60	227.70	29.82	13.05
# 12-3	52.00	6.50	14.10	148.80	175.90	22.37	12.72	# 31-3	40.10	7.00	13.00	125.60	160.60	20.92	13.03
# 12-4	56.30	7.70	15.00	231.90	232.90	30.16	12.84	총평균	55.65	7.19	14.97	167.52	222.82	29.76	13.47
# 13-1	31.50	4.50	9.50	112.50	191.00	23.38	12.47								

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 16 참조(n=50).

표 21. pCSEN-ATPG4 벡터를 이용한 형질전환체의 2차 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-.

2015년도 군위 수확 -pSEN-AT4							
	경장	분지수	마디수	형수	총 중량	중량무게	백립중
#4-1	16	2	8	16	28	2.98	10.64

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 16 참조(n=50).

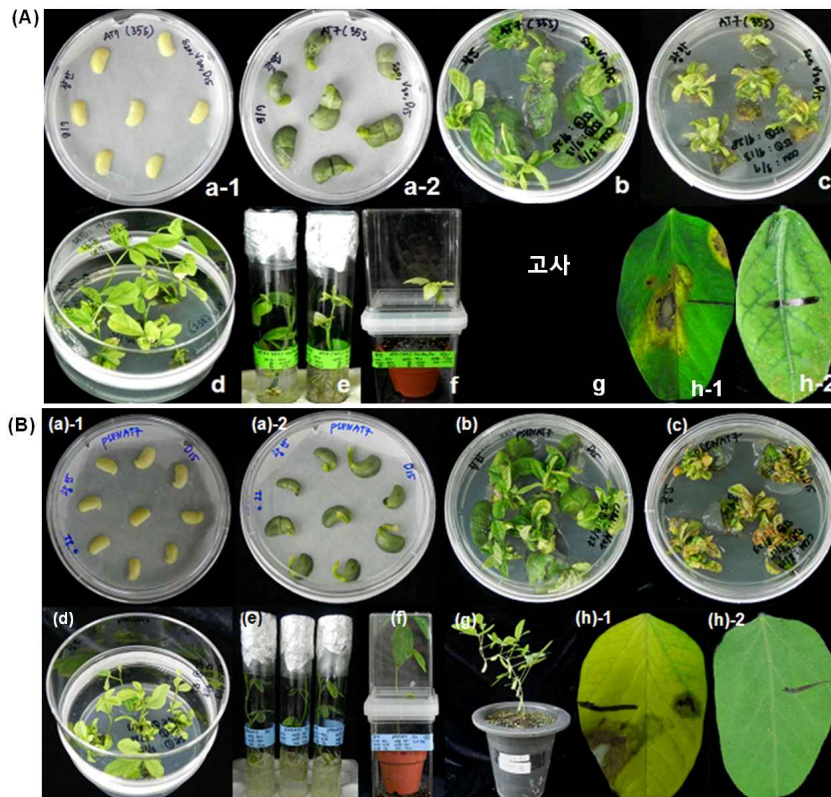


그림 56. pB2GW7.0-ATPG7(A)과 pCSEN-ATPG7(B) 벡터를 도입한 콩 형질전환체 생산 과정. (a) Half seed explants on CCM, 1-after infection, 2-after 5 days inoculation, (b) Shoot induction medium without PPT, (c) Shoot induction medium containing PPT 10 mg/L for bar selection, (d) Shoot elongation medium containing PPT 5 mg/L, (e) Rooting, (f) Acclimated putative transgenic plant in a small pot, (g) transgenic plants in a big pot, and (h) PPT leaf painting, 1-non-transgenic plant (sensitive), 2-transgenic plant (resistance).

③ ATPG7-soybean: 우리는 pB2GW7.0-ATPG7과 pCSEN-ATPG7 벡터를 상기의 고효율 콩 형질전환 시스템에 적용하여 콩 형질전환 실험을 수행하였다. pB2GW7.0-ATPG7의 경우에는 T₀ 형질전환체를 생산하였으나 종자를 맺지 못하고 고사하였다. 이는 온실에서 발생한 병충해에 대한 피해로 인해 식물체들이 고사하였다고 판단되어 진다. 그리하여 현재 pB2GW7.0-ATPG7 형질전환체를 생산하기 위해 계속 실험을 진행하고 있는 중이며 현재 19개체를 생산하였다. pCSEN-ATPG7의 경우에는 현재까지 T₀ 형질전환체를 26개체 생산하였고 계속해서 형질전환체를 생산하고 있다. pB2GW7.0-ATPG7과 pCSEN-ATPG7 콩 형질전환체 생산의 단계별 결과에 대하여 그림 56에 제시하였다. 콩 형질전환체를 생산하기 위해 접종을 수행하여 공배양을 하였고 신초를 유도하였다. 신초를 신장시킨 후 뿌리를 유도하였고 흙에서의 순환과정을 거쳐 형질전환체를 생산하였다. pCSEN-ATPG7의 T₀ 식물체가 형질전환 식물체임을 확인하기 위하여 일차적으로 도입 벡터의 선별 유전자 *BAR*의 발현으로 인한 PPT 저항성을 식물체 앞에서 PPT painting assay로 조사하였다. 그 결과, 비형질전환체의 잎은 고사하였고, pB2GW7.0-ATPG7과 pCSEN-ATPG7 형질전환체의 잎에서는 PPT에 대한 저항성을 보였다.

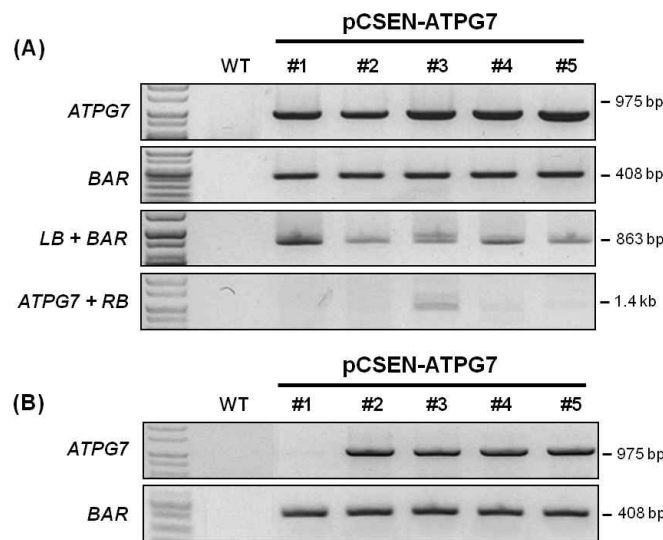


그림 57. PCR과 RT-PCR을 통한 pCSEN-ATPG7 콩 형질전환체의 유전자 도입(A) 및 유전자 발현(B) 확인.

생산된 형질전환체에 대한 유전자 도입 및 발현을 확인하기 위하여 도입 벡터의 선별 유전자 *BAR*와 도입 유전자 *ATPG7*을 대상으로 PCR과 RT-PCR을 수행하였다. 형질전환 식물체의 잎을 1 g 정량한 후 액체질소로 얼리고 막자사발에 얼린 잎을 넣고 곱게 갈아 준 후,



CTAB 방법을 이용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 도입 유전자인 *ATPG7*과 선발항생제 유전자인 *BAR*의 염기서열을 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, pCSEN-ATPG7 5개체의 형질전환체 모두에서 *ATPG7*과 *BAR* 유전자가 모두 도입되었음을 확인하였다. 또한, 삽입 벡터의 left border 및 right border 부분을 PCR을 이용하여 증폭한 결과 벡터의 T-DNA의 삽입이 손상없이 완벽하게 이루어졌음을 확인하였으며(그림 57A), 도입 유전자의 발현 또한 정상적으로 이루어졌음을 확인하였다(그림 57B).

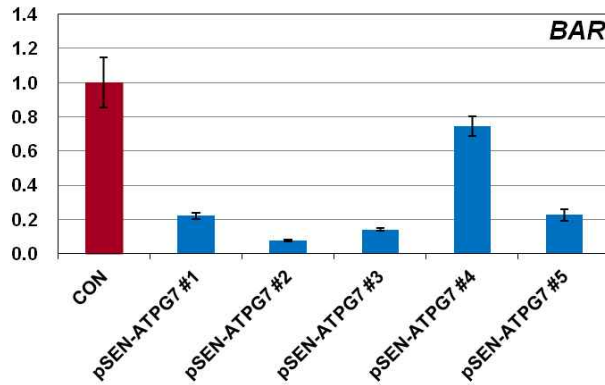


그림 58. 형질전환체의 잠정 copy 수 확인을 위하여 수행된 qRT-PCR을 통한 pCSEN-ATPG7 콩 형질전환체의 *BAR* 유전자 발현 비교, CON, 1 copy clean 콩 형질전환체; pSEN-: pCSEN-.

한편, 도입 유전자의 copy 수를 확인하기 위하여 우리는 형질전환 식물체를 대상으로 *BAR* 유전자의 발현 정도를 조사하였다. 이러한 *BAR* 유전자의 발현 정도는 확보하고 있는 1 copy 형질전환체의 *BAR* 유전자 발현을 control로 사용하여 이에 대한 상대 값으로 확인하였다. 그 결과, 생산된 5종의 형질전환체 모두 control보다 낮은 발현량을 가졌다(그림 58). 이와 같은 사실은 5종의 형질전환체 모두가 잠정 1 copy 형질전환체로 판단하게 한다. 이러한 잠정 1 copy 형질전환체는 추후 T₁ 형질전환 식물체에서 서던 분석을 통하여 copy 수에 대한 최종 확인할 것이다.

우리는 pCSEN-ATPG7 8개체의 T₁ 식물체에 대하여 GMO 포장에서 과종을 하여 PPT painting assay를 수행하였는데 1, 2, 4, 5번 line의 경우 저항성을 나타내지 못하고 고사하였고, line 3, 6, 7, 8만 PPT 저항성을 나타내었다. Line 3의 T₁ 식물체에 대하여 GMO 포장에서 1차 농업형질 분석을 수행하기 위해 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₂ 종자를 수확하였다. pCSEN-ATPG7 벡터를 적용한 콩 형질전환체의 1차 농업형질을 조사한 결과, 다양한 표현형 변이를 보였다. Line 3-1 식물체의 협수는 광안콩과 비슷하였지만 종자 총중량은 약 2배 정도 높게 나타났다. Line 3-5 식물체의 협수는 광안콩에 비해 많았고 종자 총중량은 비슷하였다. Line 3-6 식물체는 광안콩에 비해 협수가 현저히 적게 나타났지만 종자 총중량은 높게 나타났다. Line 3-7 식물체의 경우에는 협수는 광안콩에 비해 많았지만 총중량은 현저히 떨어졌다. Line 6의 경우 평균적으로 경장길이는 광안콩에 비해 조금 크거나 비슷하고 총중량의 경우 더 많은 양을 보였으니 백립중이 조금 낮게 나온 것을 확인하였다. Line 7과 8의 경우 광안콩에 비해 전체적으로 비슷하거나 상대적으로 높은 총중량과 백립

중을 보였다(표 22). GMO 포장에서의 농업형질에 대한 조사를 토대로 pCSEN-ATPG7 벡터를 이용한 콩 형질전환체의 line 3-1, 5, 6과 line 6-2, 4, 5 그리고 line 7-1, 3, 7, line 8-2, 3, 5 식물체가 wild type인 광안콩에 비해 개체당 종자 총중량이 약 2배 정도 높게 나타나 이를 다수성 형질전환체 후보로 선별하였다.

표 22. pCSEN-ATPG7 벡터를 이용한 형질전환체의 1차 농업적 특성. pSEN-: pCSEN-.

pSEN-ATPG7	경장(cm)	분지(개)	마디(개)	협수(개)	백립중(g)	총중량(g)
광안콩 (5 개체수 평균)	49.6	8	16	230	14.9	65.0
# 3-1	50	9	15	225	14.8	112.4
# 3-2	49	7	13	145	14.3	55.6
# 3-3	50	7	15	160	15.7	40.7
# 3-4	55	10	15	290	14.4	38.9
# 3-5	60	14	17	380	16.6	60.2
# 3-6	40	4	10	87	13.8	101.0
# 3-7	50	12	16	394	14.5	23.9
광안콩 (5 개체수 평균)	63.4	7	13.9	108.6	14	27.8
# 6-1	72	7	14	142	12.9	41.2
# 6-2	68	8	15	151	13.5	62.1
# 6-3	69	7	15	130	12.9	32.0
# 6-4	63	6	13	127	13.7	44.9
# 6-5	55	7	14	108	12.9	47.3
# 6-6	57	7	14	98	14.9	36.2
# 6-7	63	7	14	88	13.6	34.9
# 6-8	53	7	13	68	12.9	31.1
# 6-9	53	7	13	62	12.0	11.5
# 6-10	71	7	15	102	12.9	44.1
# 7-1	58	8	14	98	14.1	44.6
# 7-2	56	6	10	83	13.8	19.1
# 7-3	63	7	14	102	13.7	59.7
# 7-4	70	8	13	108	13.0	13.3
# 7-5	54	6	14	112	15.6	41.7
# 7-6	59	7	14	91	15.3	26.7
# 7-7	68	7	13	81	13.4	54.0
# 7-8	72	8	14	89	11.1	33.4
# 7-9	52	7	12	110	15.0	34.6
# 7-10	54	6	12	102	15.1	40.8
# 8-1	56	7	15	83	16.1	29.7
# 8-2	61	7	12	131	14.3	47.5
# 8-3	56	8	14	122	14.5	45.9
# 8-4	62	7	13	109	14.8	29.2
# 8-5	57	7	12	222	11.9	55.0
# 8-6	56	8	14	112	13.7	35.1
# 8-7	54	7	13	118	12.0	39.0
# 8-8	53	7	13	98	14.2	31.7
# 8-9	57	6	11	188	14.6	45.5
# 8-10	64	7	14	92	14.0	30.4
# 8-11	69	7	13	89	14.9	40.1
# 8-12	50	5	9	110	14.5	26.9
# 8-13	55	6	13	68	14.8	24.5
# 8-14	50	4	8	93	13.4	22.4
# 8-15	58	7	13	79	14.5	29.7
# 8-16	48	5	10	127	13.5	27.6



본 연구팀은 더 많은 *ATPG7* 도입 콩 형질전환체를 생산하여 농업형질을 조사하기 위해 우리는 콩 형질전환을 다시 수행하여 pB2GW7.0-*ATPG7* T₀ 형질전환체 19개체를 추가로 생산하였으며 pCSEN-*ATPG7* T₀ 형질전환체도 9~26번 개체까지 추가 생산하였다(그림 59).

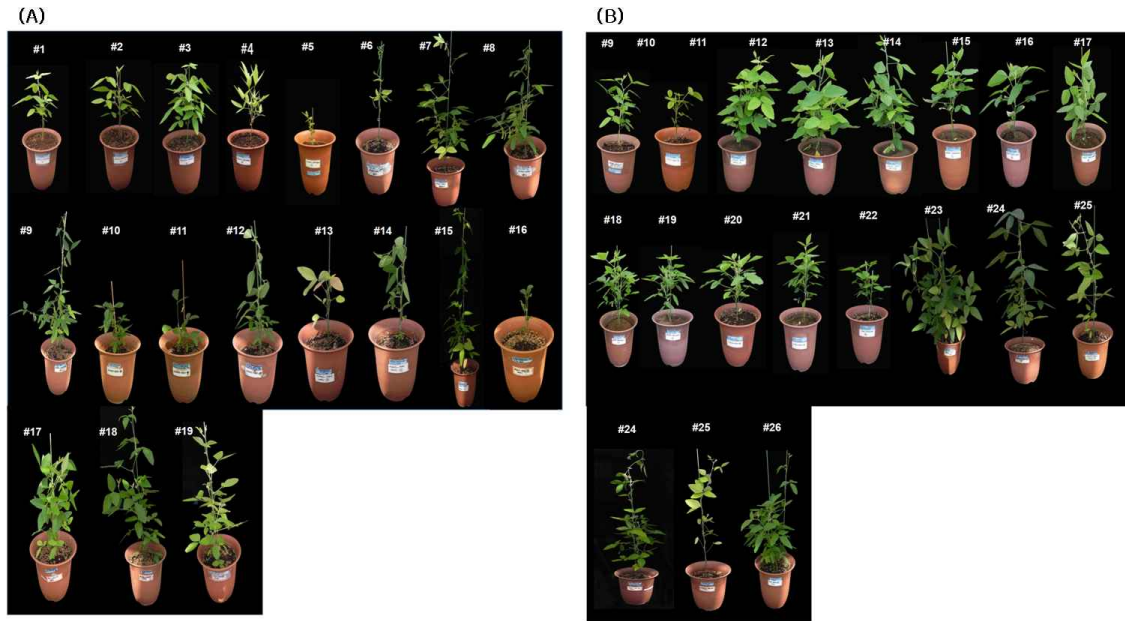


그림 59. pB2GW7.0-*ATPG7*(A)와 pCSEN-*ATPG7*(B) 벡터를 도입한 콩 형질전환체의 표현형.

추가 생산된 형질전환체에 대한 유전자 도입 및 발현을 확인하기 위하여 도입 벡터의 선별 유전자 *BAR*와 도입 유전자 *ATPG7*를 대상으로 PCR과 RT-PCR을 수행하였다. 형질전환 식물체의 잎을 1 g 정량한 후 액체질소로 얼리고 막자사발에 얼린 잎을 넣고 곱게 갈아 준 후, CTAB 방법을 이용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 도입 유전자인 *ATPG7*과 선발항생제 유전자인 *BAR*의 염기서열을 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, pB2GW7.0-*ATPG7* 유전자의 경우 1, 7, 8, 9, 15, 19 개체에서 확인되지 않았고 *BAR* 유전자의 경우 1, 7, 8, 9, 11개체를 제외한 나머지 형질전환체에서는 도입되었음을 확인하였다. 또한, 삽입 벡터의 left border 및 right border 부분을 PCR을 이용하여 증폭한 결과 벡터의 T-DNA의 left border부분이 손상되어 들어간 것으로 판단되며 right border 부분의 경우 *ATPG7* 유전자와 같이 삽입이 이루어졌음을 확인하였다(그림 60A) pCSEN-*ATPG7* 유전자의 경우 유전자는 10, 14, 21, 23, 24, 26, 27번 개체에서 확인되었고 *BAR*에서는 10, 14, 19, 21, 23, 24, 26, 27번 개체에서 확인되었다. 또한, 삽입 벡터의 left border 및 right border 부분을 PCR을 이용하여 증폭한 결과 left border는 26번, right border에서는 10번만 도입이 확인되었다(그림 60C). 그리고 형질전환체로부터 삽입 유전자의 발현을 확인하기 위하여 형질전환 식물체의 잎을 Plant RNA Purification Reagent(invitrogen)를 이용하여 RNA를 분리하였으며, 도입 유전자인 *ATPG7*과 선발항생제 유전자인 *BAR*의 염기서열을 이용하여 RT-PCR를 수행하였다. 그 결과, pB2GW7.0-*ATPG7* 1~5번 중 *ATPG7* 유전자의 경우 1번 개체를 제외하고 2~5번 개체는 정상적으로 발현하였고 *BAR* 유전자는 모두 발현되었음을 확인하였다(그림 60B). 추가 생산한 pCSEN-*ATPG7*의 경우, 유전자는 10, 14, 21, 23, 24, 26, 27번 개체에서 확인되었고 *BAR*에서는 10, 14, 19, 21, 23, 24, 26, 27

번 개체에서 확인되었다. 또한, 삽입 벡터의 left border 및 right border 부분을 PCR을 이용하여 증폭한 결과 left border는 26번, right border에서는 10번만 도입이 확인되었다(그림 60C). 또한 삽입 유전자의 발현을 확인 해본 결과 pCSEN-ATPG7의 경우 21번 개체까지 분석하였는데 그 중 10, 14, 21번 개체만 유전자와 *BAR* 모두 발현하는 것을 확인하였고 19번 개체는 *BAR* 유전자만 발현된 것을 확인 하였다(그림 60D). 우리는 유전자 도입 및 발현에 대한 분자 생물학적 분석을 반복적으로 수행하여 상기의 결과에 대한 정확성을 제시하고자 한다.

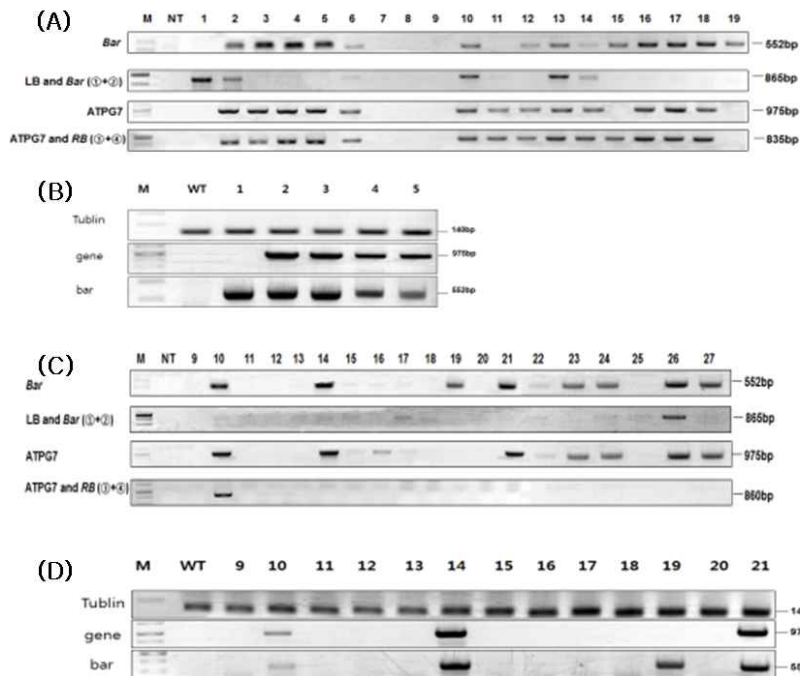


그림 60. PCR과 RT-PCR을 통한 pB2GW7-ATPG7와 pCSEN-ATPG7 콩 형질전환체의 유전자 도입(A, C) 및 발현(B, D) 확인. (A) pB2GW7-ATPG7, (B) pB2GW7-ATPG7, (C) pCSEN-ATPG7, and (D) pCSEN-ATPG7.

우리는 pB2GW7.0-ATPG7의 경우 #1~4까지 T₁ 식물체에 대하여 GMO 포장에서 파종을 하여 PPT painting assay를 수행하였으나 2번 개체는 전체적으로 고사하였고, 4번 개체의 경우 하나의 형질전환체만 선발되어 T₂ 종자를 수확 하였다. 각 개체별로 다양한 표현형을 나타내었지만 wild type에 비해 line 3, 4의 경우 나쁜 표현형을 보였으나 line 1의 경우 백립중 및 종자 수량이 높게 나타났다(표 23). pCSEN-ATPG7의 경우 3년차에 8개체의 T₁ 식물체에 대하여 GMO 포장에서 파종을 하여 PPT painting assay를 수행하였는데 1, 2, 4, 5번 line의 경우 저항성을 나타내지 못하고 고사하였고, line 3, 6, 7, 8만 PPT 저항성을 나타내었다. 4차년도에 선발된 4 line 중 대조군에 비해 수량 및 백립중이 우수한 line들을 선정하여 T₂ 식물체에 대하여 GMO 포장에서 2차 농업형질 분석을 수행하기 위해 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₃ 종자를 수확하였다. pCSEN-ATPG7 벡터를 적용한 콩 형질전환체의 2차 농업형질을 조사한 결과, 다양한 표현형 변이를 보였다. 하지만 전체적으로 대조군에 비해 수량이나 표현형이 낮게 나타났다(표 24). 이는 심한 바이러스 증상과 비슷한 오갈증으로 인해 발생되었다고 판단되어 진다. 이에 GMO 포장에서의 농업형질에 대한 조사를 토대로 pCSEN-ATPG7 벡터를 이용한 콩 형질전환체 중에 wild type과 수량이 비슷하거나 중

자 수가 다른 line에 비해 높은 형질을 보인 3-1-3, 3-6-6, 6-2-9, 6-5-6, 7-1-1, 7-7-6, 8-2-9, 8-3-3 line들을 다시 세대 전개하여 포장검정을 실시하였다.

표 23. pB2GW7.0-ATPG7 벡터를 이용한 형질전환체의 1차 농업적 특성 분석. p35S-: pB2GW7.0-

2015년도 군위 수확 -p35S-AT7							
	광장	분지수	마디수	협수	총 증자	증자 무게	백립중
#1-1	66	8	16	188	313	48.22	15.41
#1-2	57	8	16	235	336	48.34	14.39
#1-3	45	6	13	131	252	37.45	14.86
#1-4	58	8	14	129	361	51.76	14.34
#1-5	70	7	14	223	221	37.79	17.10
#1-6	66	9	15	252	201	21.43	10.66
#1-7	57	8	15	320	322	45.94	14.27
#1-8	67	7	13	223	178	24.1	13.54
#1-9	60	7	16	131	160	22.49	14.06
#1-10	68	6	15	155	206	27.98	13.58
평균	61.40	7.40	14.70	198.70	255.00	36.55	14.22
#3-1	60	8	17	224	270	32.22	11.93
#3-2	55	7	16	198	276	35.03	12.69
#3-3	61	7	15	150	198	27.34	13.81
#3-4	56	8	17	231	346	48.54	14.03
#3-5	62	7	16	193	338	47.22	13.97
#3-6	59	7	16	204	282	39.3	13.94
#3-7	61	8	17	173	176	24.85	14.12
#3-8	62	8	15	212	235	31.42	13.37
#3-9	67	10	17	335	516	65.83	12.76
#3-10	53	7	16	207	224	31.58	14.10
평균	59.60	7.70	16.20	212.70	286.10	38.33	13.47
#4-1	32	4	13	122	205	21.52	10.50
출명균	59.14	7.38	15.33	201.71	267.43	36.68	13.69

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 16 참조(n=50).

표 24. pCSEN-ATPG7 벡터를 이용한 형질전환체의 2차 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-

2015년도 군위 수확 -pSEN-AT7												
군위	광장	분지수	마디수	협수	총 증자	증자 무게	백립중	군위	광장	분지수	마디수	협수
#1-1	45	6	16	127	229	32.2	13.42					
#1-2	84	8	12	150	187	20.22	12.11					
#1-3	49	6	16	182	283	37.87	12.00					
#1-4	37	5	11	113	194	25.87	12.34					
#1-5	45	6	13	88	119	14.42	12.13					
#1-6	37	6	10	117	197	28.17	12.78					
#1-7	47	5	14	180	144	22.64	12.30					
#1-8	42	7	13	148	186	20.2	12.17					
#1-9	41	5	12	100	240	31.40	12.69					
출명균	42.22	5.84	12.89	129.67	186.00	28.83	12.76					
#2-1	40	3	13	180	88	10.86	12.85					
#2-2	41	14	13	122	143	17.85	12.40					
#2-3	62	6	16	163	215	29.98	13.86					
#2-4	42	7	13	82	141	18.8	13.19					
#2-5	62	10	12	120	212	27.11	12.79					
#2-6	27	5	10	88	169	20.87	12.17					
#2-7	42	6	13	88	127	12.28	14.37					
#2-8	37	10	11	704	188	22.37	14.43					
출명균	41.83	8.83	12.79	117.80	186.00	20.70	13.29					
#3-1	40	5	11	131	220	30.82	13.37					
#3-2	66	6	12	102	124	13.66	11.21					
#3-3	39	5	9	174	136	19.86	12.26					
#3-4	48	5	11	180	209	28.51	12.80					
#3-5	81	6	12	88	127	19.78	12.62					
#3-6	43	3	13	188	280	38.38	13.23					
#3-7	39	7	12	121	272	36.24	13.04					
#3-8	38	3	10	64	111	13.22	11.81					
#3-9	39	5	12	78	109	13.37	12.72					
#3-10	27	4	9	77	127	16.12	11.04					
출명균	39.80	6.70	11.30	118.40	177.40	22.37	12.40					
#4-1	44	5	14	112	144	19.06	13.69					
#4-2	69	6	16	144	181	19.17	12.70					
#4-3	46	6	16	186	173	22.4	13.85					
#4-4	46	7	16	108	176	22.87	12.30					
#4-5	42	6	12	120	100	12.84	12.66					
#4-6	42	7	14	190	240	32.04	11.60					
#4-7	47	6	14	110	161	21.62	13.43					
#4-8	38	7	13	128	168	20.84	13.19					
#4-9	37	5	12	217	311	42.37	13.62					
#4-10	45	7	16	204	279	36.62	13.11					
출명균	43.10	6.80	13.80	180.70	189.30	24.72	13.07					
#5-1	44	5	14	160	108	14.23	13.42					
#5-2	42	6	12	90	117	13.98	13.67					
#5-3	42	7	16	168	228	30.32	13.24					
#5-4	48	7	16	124	242	30.87	12.83					
#5-5	38	7	12	90	118	16.49	12.87					
#5-6	40	10	12	191	237	30.28	12.76					
#5-7	57	6	16	128	117	16.33	13.85					
#5-8	48	7	16	97	172	22.88	13.19					
#5-9	42	7	14	131	136	19.44	14.29					
#5-10	18	4	14	120	114	15.81	13.22					
출명균	41.20	7.00	14.00	136.00	185.00	21.10	13.47					
#6-1	48	6	14	148	216	29.28	13.67					
#6-2	66	6	16	188	148	19.8	13.83					
#6-3	51	5	16	123	189	21.72	13.17					
#6-4	66	7	16	210	221	28.33	13.27					
#6-5	47	7	16	107	180	24.67	13.71					
#6-6	68	6	16	177	248	32.48	13.22					
#6-7	48	4	14	130	168	22.87	13.81					
#6-8	47	6	16	88	128	16.54	13.23					
#6-9	66	7	16	160	160	20.94	13.67					
#6-10	48	6	16	104	134	18.32	13.67					
출명균	51.40	6.10	16.20	140.90	179.00	23.68	13.47					
#7-1	48	6	13	144	248	34.68	13.87					
#7-2	44	6	15	173	237	32.74	13.81					
#7-3	46	6	16	90	112	14.84	13.25					
#7-4	40	5	13	104	141	19.47	13.87					
#7-5	38	6	11	108	141	17	12.06					
#7-6	28	3	10	57	82	11.18	12.16					
#7-7	67	6	16	122	170	19.94	11.33					
#7-8	48	5	16	86	102	12.84	12.88					
#7-9	23	5	9	102	163	18.64	11.06					
출명균	38.30	6.80	12.30	104.10	148.10	18.82	12.40					
#8-1	42	6	14	180	244	28.21	11.81					
#8-2	38	6	14	128	220	30.23	12.74					
#8-3	47	4	12	87	98	12.01	12.76					
#8-4	38	6	12	120	220	29.92	12.80					
#8-5	43	6	14	86	142	20.77	12.82					
#8-6	36	6	12	42	134	20.88	16.34					
#8-7	48	6	14	69	90	12.3	12.21					
#8-8	37	5	13	82	84	10.02	11.80					
#8-9	41	6	13	60	109	14.11	12.94					
#8-10	36	4	11	49	88	9.78	11.00					
출명균	39.60	6.30	12.90	82.80	142.80	18.99	12.80					
#9-1	42	6	12	87	122	29.68	13.37					
#9-2	40	7	16	80	90	12.47	12.74					
#9-3	48	6	14	88	131	18.84	12.88					
#9-4	42	3	12	108	129	19.92	14.24					
#9-5	46	4	13	87	87	9.9	12.06	12.99				
#9-6	60	5	17	112	112	13.28	13.22					
#9-7	48	16	14	123	170	23.82	13.27					
#9-8	48	6	16	82	131	20.17	12.40					
#9-9	62	6	16	141	220	21.12	14.18					
#9-10	60	6	14	86	132	18.81	14.10					
출명균	47.10	7.00	14.30	81.70	148.10	20.36	13.74					
출명균	46.34	6.43	13.28	117.24	188.16	22.30	13.19					

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 16 참조(n=50).

④ ATPG8-soybean: 우리는 항시 발현 promoter와 inducible promoter를 사용한



pB2GW7.0-ATPG8과 pCSEN-ATPG8 벡터를 상기의 고효율 콩 형질전환 시스템에 적용하여 콩 형질전환 및 형질전환체 생산을 수행하였다. 이러한 pB2GW7.0-ATPG8과 pCSEN-ATPG8 벡터에 대한 콩 형질전환체 생산의 단계별 결과에 대한 그림은 그림 61에 제시하였다. 콩 형질전환체를 생산하기 위해 접종을 수행하여 공배양을 하였고 신초를 유도하였다. 신초를 신장시킨 후 뿌리를 유도하였고 흙에서의 순환과정을 거쳐 T₀ 형질전환체를 생산하였다. 이러한 과정을 통하여 현재까지 pB2GW7.0-ATPG3 벡터 형질전환체의 경우 3개체, 그리고 pCSEN-ATPG3 벡터 형질전환체의 경우도 3개체를 생산하여, ATPG8 유전자에 대하여 총 6종의 형질전환체를 생산하였다.

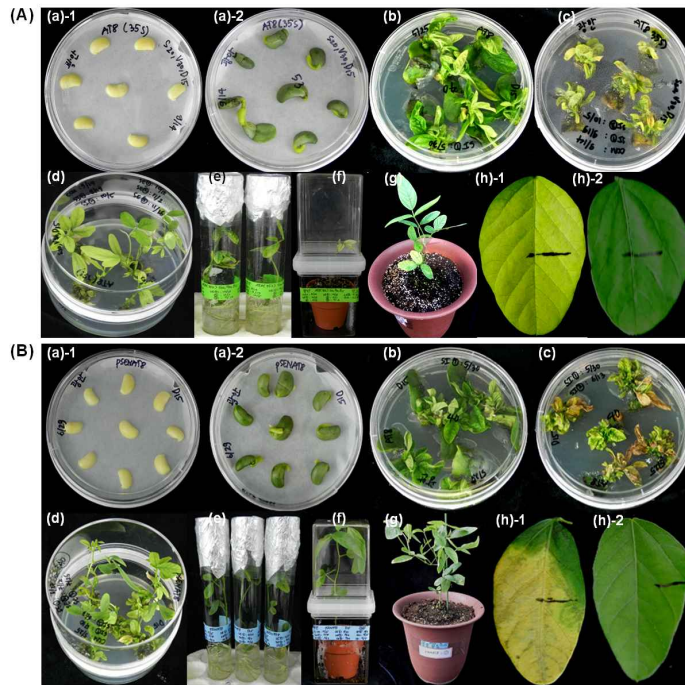


그림 61. pB2GW7.0-ATPG8(A)과 pCSEN-ATPG8(B) 벡터를 이용한 콩 형질전환체 생산 과정. (a) Half seed explants on CCM, 1-after infection, 2-after 5 days inoculation, (b) Shoot induction medium without PPT, (c) Shoot induction medium containing PPT 10 mg/L for bar selection, (d) Shoot elongation medium containing PPT 5 mg/L, (e) Rooting, (f) Acclimated putative transgenic plant in a small pot, (g) transgenic plants in a big pot, and (h) PPT leaf painting, 1-non-transgenic plant (sensitive), 2-transgenic plant (resistance).

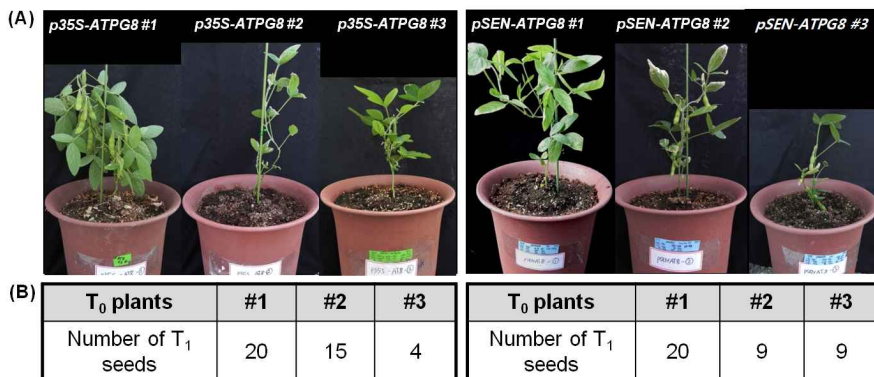


그림 62. pB2GW7.0-ATPG8과 pCSEN-ATPG3 벡터를 도입한 콩 형질전환체의 표현형(A) 및 형질전환체로부터 수확된 T₁ 형질전환 종자 수(B). p35S-: pB2GW7.0-, pSEN-: pCSEN-.

생산된 T₀ 식물체가 형질전환체인지를 확인하기 위하여 우리는 선별 마커 유전자 *BAR*의 발현으로 인한 PPT 저항성을 가지는지를 식물체의 잎에 PPT painting assay를 수행하였다. 그 결과, 비형질전환체의 잎은 고사하였고, pB2GW7.0-ATPG8과 pCSEN-ATPG8 형질전환체의 잎에서는 PPT에 대한 저항성을 보였다. 이와 같이 PPT 저항성을 가지는 3개체의 pB2GW7.0-ATPG8과 3개체의 pCSEN-ATPG8 콩 형질전환체의 표현형은 그림 62A에, 그리고 형질전환체로부터 수확한 T₁ 형질전환 종자의 개수는 그림 62B에 제시하였다.

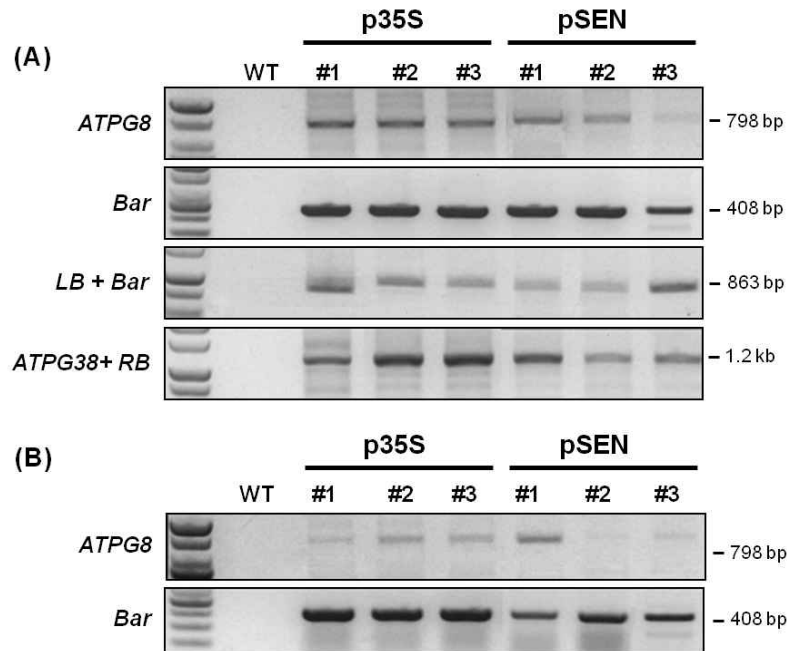


그림 63. PCR과 RT-PCR을 통한 pB2GW7.0-ATPG8과 pCSEN-ATPG8 콩 형질전환체의 유전자 도입(A) 및 유전자 발현(B) 확인. p35S: pB2GW7.0-ATPG8, pCSEN: pCSEN-ATPG8.

생산된 형질전환체에 대한 유전자 도입 및 발현을 확인하기 위하여 도입 벡터의 선별 유전자 *BAR*와 도입 유전자 *ATPG8*을 대상으로 PCR과 RT-PCR을 수행하였다. 형질전환 식물체의 잎을 1 g 정량한 후 액체질소로 얼리고 막자사발에 얼린 잎을 넣고 곱게 갈아 준 후, CTAB 방법을 이용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 도입 유전자인 *ATPG8*과 선발항생제 유전자인 *BAR*의 염기서열을 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, pB2GW7.0-ATPG8 3개체와 pCSEN-ATPG8 3개체의 형질전환체 모두에서 *ATPG8*과 *BAR* 유전자가 모두 도입되었음을 확인하였다. 또한, 삽입 벡터의 left border 및 right border 부분을 PCR을 이용하여 증폭한 결과 벡터의 T-DNA의 삽입이 손상없이 완벽하게 이루어졌음을 확인하였다(그림 63A). 형질전환체로부터 삽입 유전자의 발현을 확인하기 위하여 형질전환 식물체의 잎을 Plant RNA Purification Reagent(invitrogen)를 이용하여 RNA를 분리하였으며, 도입 유전자인 *ATPG8*과 선발항생제 유전자인 *BAR*의 염기서열을 이용하여 RT-PCR를 수행하였다. 그 결과, pB2GW7.0-ATPG8과 pCSEN-ATPG8 형질전환체 모두에서 *ATPG8*과 *BAR* 유전자가 모두 발현되었음을 확인하였다(그림 63B). 형질전환체 생산에 적용된 *ATPG8* 유전자는 유전자의 발현 정도에 따라 다수성 형질 및 녹기연장의 형질을 제공하므로 이러한 유전자 발현 연구는 추후 형질전환체의 목적형질 및 다수성에 대한 농업형질을 분석하는데 있어서 매우 중요한 역할을 담

당할 것이다.

한편, 도입 유전자의 copy 수를 확인하기 위하여 우리는 형질전환 식물체를 대상으로 *BAR* 유전자의 발현 정도를 조사하였다. 이러한 *BAR* 유전자의 발현 정도는 확보하고 있는 1 copy 형질전환체의 *BAR* 유전자 발현을 control로 사용하여 이에 대한 상대 값으로 확인하였다. 그 결과, 생산된 6종의 형질전환체 모두 control보다 낮은 발현량을 가졌다(그림 64). 이와 같은 사실은 6종의 형질전환체 모두가 1 copy 형질전환체일 것으로 생각된다. 이러한 잠정 1 copy 형질전환체는 추후 T₁ 형질전환 식물체에서 서던 분석을 통하여 copy 수에 대한 최종 확인할 것이다.

우리는 pB2GW7.0-ATPG8 3개체의 T₁ 식물체에 대하여 GMO 포장에서 파종하여 PPT painting assay를 수행하였으나, line 3 식물체는 모두 고사하여 line 1과 2 식물체에 대하여 GMO 포장에서의 1차 농업형질을 조사하였다. 이를 수행하기 위해 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₂ 종자를 수확하였다. pB2GW7.0-ATPG8 벡터를 적용한 콩 형질전환체 line 1과 2 식물체로부터 1차 농업형질을 조사한 결과, line 1 T₁ 식물체들의 협수는 광안콩과 비슷하거나 많았으며 종자 총중량은 line 1-2를 제외한 line 1-1, 1-3, 1-4 그리고 1-5는 광안콩보다 높게 나타났다. Line 1-2의 종자 수확량 감소는 pB2GW7.0-ATPG3 도입 식물체와 마찬가지로 도복 및 바이러스 증상으로 인해 발생되었다고 판단되어진다(표 25). 따라서 line 1-1, 1-4, 그리고 1-5는 다수성 농업형질에 대한 우량 계통인 것으로 생각되며, 추후 세대진전을 통해 2차 농업형질 분석을 수행하였다.

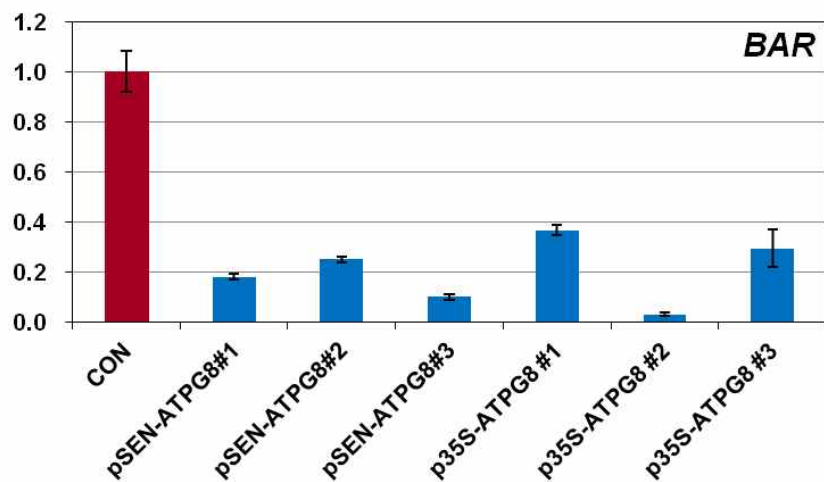


그림 64. 형질전환체의 잠정 copy 수 확인을 위하여 수행된 qRT-PCR을 통한 pB2GW7.0-ATPG8과 pCSEN-ATPG8 콩 형질전환체의 *BAR* 유전자 발현 비교, CON, 1 copy clean 콩 형질전환체; p35S-: pB2GW7.0-, pSEN-: pCSEN-.

pB2GW7.0-ATPG8 벡터를 적용한 콩 형질전환체 line 1-1, 1-4, 1-5, 2-1을 세대진전하여 2차 농업형질 및 목표형질을 분석한 결과, wild type에 비해 형질전환 식물체들의 협수와 종자 총중량은 현저하게 떨어졌는데(표 26), 이는 pB2GW7.0-ATPG3 도입 식물체와 마찬가지로 도복 및 바이러스 증상으로 인해 발생되었다고 판단되어지며 line 1-4-1, 1-5-6, 2-1-1의 경우 대조군에 비해 비슷하거나 조금 향상된 표현형을 보여 추후 세대 진전시켜 이벤트 후보로서의 형질



을 가지는 지를 확인하였다.

표 25. pB2GW7.0-ATPG8 벡터를 이용한 형질전환체의 1차 농업적 특성 분석. p35S-: pB2GW7.0-

ATPG8 line	경장 (cm)	분지 (개)	마디 (개)	협수 (개)	백립중 (g)	총중량 (g)
광안콩 (5 개체수 평균)	49.6	8	16	230	14.9	65
p35S ATPG8-1-1	48	11	16	392	15.4	101
p35S ATPG8-1-2	40	9	16	215	14.4	57.8
p35S ATPG8-1-3	42	10	14	200	16.7	67
p35S ATPG8-1-4	42	9	15	212	15.4	67.5
p35S ATPG8-1-5	45	11	14	260	16	89.1
p35S ATPG8-2-1	17	3	5	48	.	6.5
p35S ATPG8-2-2	30	3	14	65	.	7
p35S ATPG8-2-3	24	0	12	33	.	3.9
p35S ATPG8-2-4	25	4	14	60	.	9
p35S ATPG8-2-5	25	1	12	40	.	3.5

표 26. pB2GW7.0-ATPG8 벡터를 이용한 형질전환체의 2차 농업적 특성 분석. p35S-: pB2GW7.0-

2015년도 군위 수확 -p35S-AT8							
	경장	분지수	마디수	협수	총협자	협자 무게	백립중
#1-1-1	44	4	15	69	90	12.68	14.09
#1-1-2	42	5	14	69	99	13.17	13.30
#1-1-3	43	5	14	90	112	15.41	13.76
#1-1-4	37	6	14	118	200	26.54	13.27
#1-1-5	49	7	16	142	142	18.35	12.92
#1-1-6	46	6	16	125	136	18.37	13.51
#1-1-7	49	7	15	134	163	21	12.88
#1-1-8	50	6	17	183	181	22.46	12.41
#1-1-9	48	6	15	142	152	19.5	12.83
#1-1-10	47	6	15	137	144	17.83	12.38
합계	45.50	5.80	15.10	120.60	141.90	18.53	13.14
#1-4-1	47	7	14	151	313	42.78	13.67
#1-4-2	37	7	13	128	211	28.86	13.68
#1-4-3	50	7	16	111	117	17.97	15.36
#1-4-4	55	6	15	150	161	20.41	12.68
#1-4-5	52	5	15	137	135	17.57	13.01
#1-4-6	43	6	15	136	147	21.16	14.39
#1-4-7	57	7	15	131	89	11.83	13.29
#1-4-8	44	6	13	130	171	21.92	12.82
#1-4-9	48	9	16	241	245	29.68	12.11
#1-4-10	46	5	14	140	153	20.68	13.52
합계	47.90	6.50	14.60	145.50	174.20	23.29	13.45
#1-5-1	33	6	13	11	161	22.4	13.91
#1-5-2	39	6	15	118	174	23.21	13.34
#1-5-3	4	4	12	98	99	12.95	13.08
#1-5-4	36	6	15	158	214	27.57	12.88
#1-5-5	38	6	13	109	199	26.62	13.38
#1-5-6	44	9	17	190	275	37.03	13.47
#1-5-7	39	5	13	187	154	20.43	13.27
#1-5-8	43	6	15	170	228	30.02	13.17
#1-5-9	41	7	13	154	145	18.75	12.93
#1-5-10	43	9	15	204	279	35.54	12.74
합계	36.00	6.40	14.10	139.90	192.80	25.45	13.22
#2-1-1	46	9	16	214	312	40.34	12.93
총합계	43.23	6.32	14.65	137.87	174.23	23.00	13.26

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 16 참조(n=50).

다른 콩 형질전환 벡터인 pCSEN-ATPG8을 이용하여 생산한 T₀ 콩 형질전환체 3개체 또한

GMO 포장에서 과종을 하였으나, PPT 처리에 식물체 모두 고사하였다. 그리하여 우리는 pCSEN-ATPG8 벡터를 상기의 고효율 콩 형질전환체 시스템에 적용하여 콩 형질전환 및 T₀ 형질전환체 생산을 계속 수행하고 있다. 현재까지 생산된 pCSEN-ATPG8 도입 콩 형질전환체중 PPT에 저항성을 보인 pCSEN-ATPG8 도입 식물체는 현재까지 6개체이며(그림 65), 계속 형질전환 과정이 진행 중에 있다. 이후 생산된 식물체로부터 유전자 도입 및 발현 분석, 형질전환체 copy 수 분석 등을 수행할 예정이다.

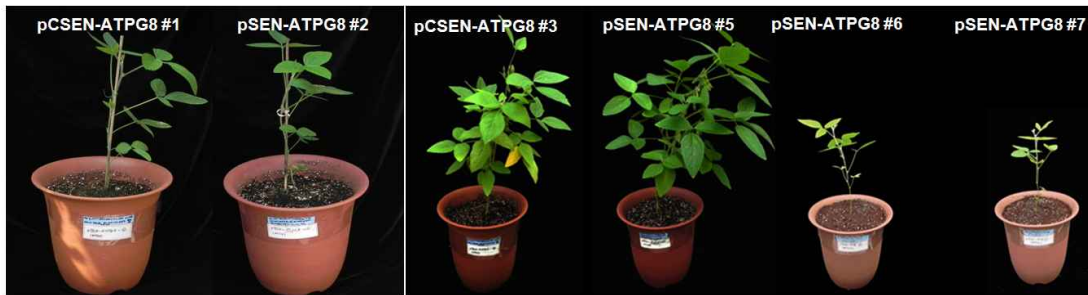


그림 65. pCSEN-ATPG8 벡터를 도입한 콩 형질전환체의 표현형. pSEN-: pCSEN-.

새로 생산된 형질전환체에 대한 유전자 도입 및 발현을 확인하기 위하여 도입 벡터의 선별 유전자 *BAR*와 도입 유전자 *ATPG8*을 대상으로 PCR과 RT-PCR을 수행하였다. 형질전환 식물체의 잎을 1 g 정량한 후 액체질소로 얼리고 막자사발에 얼린 잎을 넣고 곱게 갈아 준 후, CTAB 방법을 이용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 도입 유전자인 *ATPG8*과 선발항생제 유전자인 *BAR*의 염기서열을 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, pCSEN-ATPG8 3번과 7번 개체의 형질전환체에서만 *ATPG8*과 *BAR* 유전자가 모두 도입되었음을 확인하였다. 또한, 삽입 벡터의 left border 부분을 PCR을 이용하여 증폭한 결과 벡터의 T-DNA의 삽입이 손상없이 완벽하게 이루어졌음을 확인하였다(그림 66).

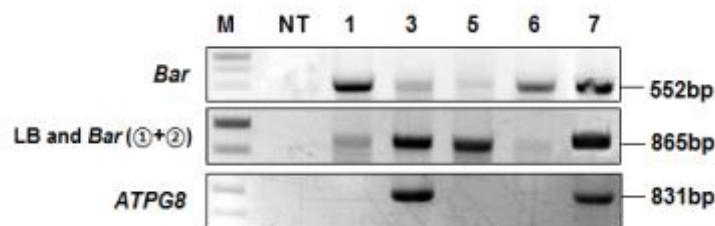


그림 66. PCR을 통한 pCSEN-ATPG8 콩 형질전환체의 유전자 도입 확인

우리는 pCSEN-ATPG8 6개체의 T₁ 식물체에 대하여 유전자 도입 및 발현을 확인 하여 line 3, 7을 GMO 포장에서 과종하였다. 과종하여 PPT painting assay를 수행하였으나, line 7 식물체는 모두 고사하여 line 3 식물체에 대하여 GMO 포장에서의 1차 농업형질을 조사하였다. 이를 수행하기 위해 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₂ 종자를 수확하였다(표 27). pCSEN-ATPG8 벡터를 적용한 콩 형질전환체 line 3 식물체로부터 농업형질을 조사한 결과, T₁ 식물체들의 협수 및 총 종자 수 등은 광안콩과 비슷하거나

작았으나, 백립중 및 각 종자들의 무게가 광안콩에 비해 높게 나타난 것을 확인하였다. 이에 5차년도에 다수성 농업형질에 대한 우량 계통인 것으로 생각되는 3-2, 3-9를 세대진전을 통해 농업형질 및 목표형질에 대한 분석을 수행할 예정이다.

표 27. pCSEN-ATPG8 벡터를 이용한 형질전환체의 1차 농업적 특성. pSEN-: pCSEN-

2015년도 군위 수확 -pSEN-AT8								
	결장	분지수	마디수	협수	총 종자	종자 무게	백립중	
#3-1	48	5	16	144	218	31.93	14.65	
#3-2	40	8	16	193	292	46.4	15.89	
#3-3	42	5	15	158	315	47.97	15.23	
#3-4	38	7	13	132	95	14.18	14.93	
#3-5	42	5	16	132	215	31.42	14.61	
#3-6	45	4	16	129	276	44.42	16.09	
#3-7	45	4	17	173	165	24.6	14.91	
#3-8	41	6	16	170	209	29.85	14.28	
#3-9	50	5	19	175	357	54.31	15.21	
#3-10	41	8	16	199	288	45.42	15.77	
평균	43.20	5.70	16.00	160.50	243.00	37.05	15.16	

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 16 참조(n=50).

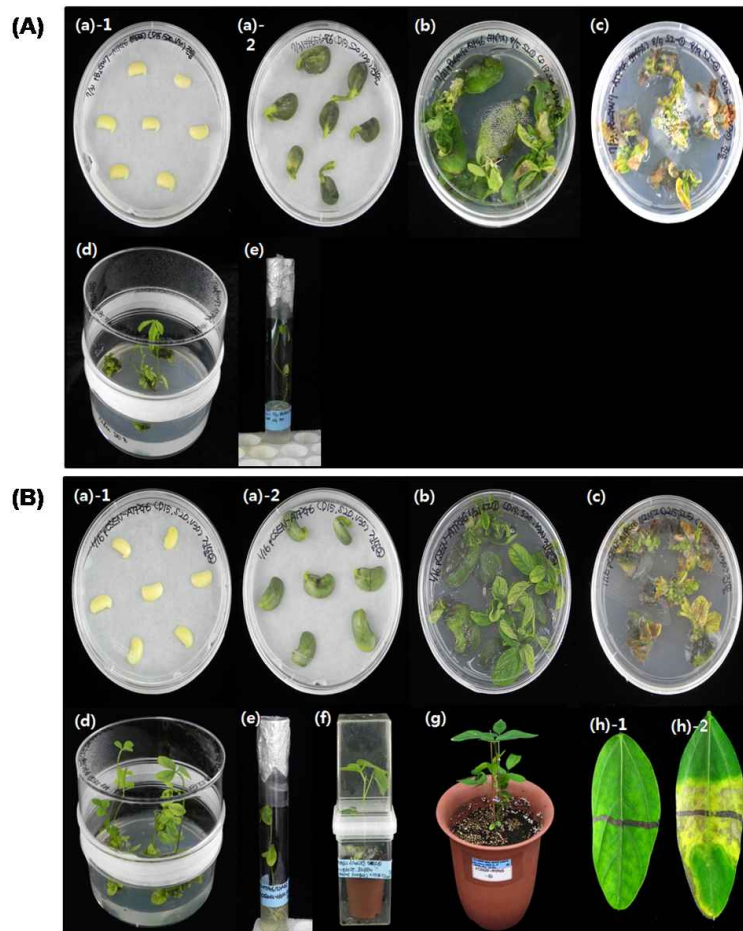


그림 67. pB2GW7.0-ATPG6(A)과 pCSEN-ATPG6(B) 벡터를 이용한 콩 형질전환체 생산 과정. (a) Half seed explants on CCM, 1-after infection, 2-after 5 days inoculation, (b) Shoot induction medium without PPT, (c) Shoot induction medium containing PPT 10 mg/L for bar selection, (d) Shoot elongation medium containing PPT 5 mg/L, (e) Rooting, (f) Acclimated putative transgenic plant in a small pot, (g) transgenic plants in a big pot, and (h) PPT leaf painting, 1-transgenic plant (resistance), 2-non-transgenic plant (sensitive).



⑤ **ATPG6(*AHL22*)-soybean**: 우리는 두 종류의 벡터, pB2GW7.0-ATPG6과 pCSEN-ATPG6 벡터를 상기의 고효율 콩 형질전환 시스템에 적용하여 콩 형질전환 및 형질전환체 생산을 수행하였다. 이러한 pB2GW7.0-ATPG6과 pCSEN-ATPG6 벡터에 대한 콩 형질전환체 생산의 단계별 결과에 대한 그림은 그림 67에 제시하였다. 콩 형질전환체를 생산하기 위해 접종을 수행하여 공배양을 하였고 신초를 유도하였다. 신초를 신장시킨 후 뿌리를 유도하였고 흙에서의 순환 과정을 거쳐 T₀ 형질전환체를 생산하였다. 이러한 과정을 통하여 현재까지 pB2GW7.0-ATPG6 벡터 적용의 경우, small pot에서 모두 고사하였으나, pCSEN-ATPG6 벡터 적용의 경우도 10개체의 형질전환 식물을 생산하였다.

생산된 T₀ 식물체가 형질전환체인지를 확인하기 위하여 우리는 선별 마커 유전자 *BAR*의 발현으로 인한 PPT 저항성을 가지는지를 식물체의 잎에 PPT painting assay를 수행하였다. 그 결과, 비형질전환체의 잎은 고사하였고, pCSEN-ATPG6 형질전환체의 잎에서는 PPT에 대한 저항성을 보였다. 이와 같이 PPT 저항성을 가지는 10개체의 pCSEN-ATPG6 콩 형질전환체의 표현형은 그림 68에 제시하였다.



그림 68. pCSEN-ATPG6 벡터를 도입한 콩 형질전환체의 표현형. pSEN-: pCSEN-.

생산된 형질전환체에 대한 유전자 도입 및 발현을 확인하기 위하여 도입 벡터의 선별 유전자 *BAR*와 도입 유전자 *ATPG6*을 대상으로 PCR과 RT-PCR을 수행하였다. 형질전환 식물체의 잎을 1 g 정량한 후 액체질소로 얼리고 막자사발에 얼린 잎을 넣고 곱게 갈아 준 후, CTAB 방법을 이용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 도입 유전자인 *ATPG6*과 선발항생제 유전자인 *BAR*의 염기서열을 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, pCSEN-ATPG6에서 *ATPG6* 유전자의 경우 2, 5, 6, 9번 개체를 제외한 나머지에서 확인되었고 *BAR* 유전자의 경우 2, 5, 6번 개체를 제외한 나머지 형질전환체들에서 유전자가 도입되었음을 확인하였다(그림 69A). 또한 형질전환체로부터 삽입 유전자의 발현을 확인하기 위하여 pCSEN-ATPG6 형질전환 식물체중 5개체의 잎으로부터 Plant RNA Purification Reagent(invitrogen)를 이용하여 RNA를 분리하였으며, 도입 유전자인 *ATPG6*과 선발항생제 유전자인 *BAR*의 염기서열을 이용하여

RT-PCR를 수행하였다. 그 결과, *ATPG6* 유전자의 경우 5개체 중 1번과 3번 2개체에서만 발현된 것으로 확인되었고 *BAR* 유전자의 경우도 같은 2개체에서만 발현되는 것을 확인 하였다(그림 69B). 추후 남은 5개체의 유전자 도입 유무 및 발현량 확인, 그리고 pB2GW7.0-ATPG6의 재접종을 수행할 예정이다.

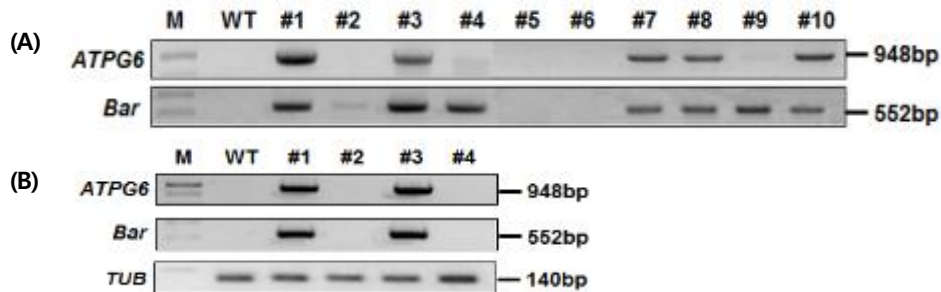


그림 69. PCR과 RT-PCR을 통한 pCSEN-ATPG6 콩 형질전환체의 유전자 도입(A) 및 유전자 발현(B) 확인.

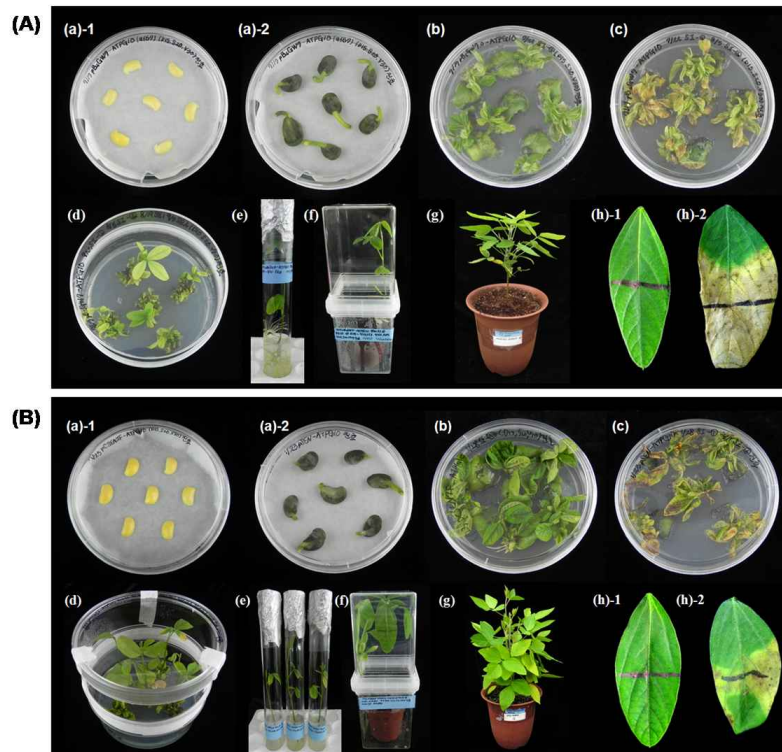


그림 70. pB2GW7.0-ATPG10(A)과 pCSEN-ATPG10(B) 벡터를 이용한 콩 형질전환체 생산 과정. (a) Half seed explants on CCM, 1-after infection, 2-after 5 days inoculation, (b) Shoot induction medium without PPT, (c) Shoot induction medium containing PPT 10 mg/L for bar selection, (d) Shoot elongation medium containing PPT 5 mg/L, (e) Rooting, (f) Acclimated putative transgenic plant in a small pot, (g) transgenic plants in a big pot, and (h) PPT leaf painting, 1-transgenic plant (resistance), 2-non-transgenic plant (sensitive).

⑥ *ATPG10(AHL17)*-soybean: 우리는 두 종류의 벡터, pB2GW7.0-ATPG10과 pCSEN-ATPG10 벡터를 상기의 고효율 콩 형질전환 시스템에 적용하여 콩 형질전환 및 형질전환체 생산을 수행하였다. 이러한 pB2GW7.0-ATPG10과 pCSEN-ATPG10 벡터에 대한 콩 형질전환체 생산의



단계별 결과에 대한 그림은 그림 70에 제시하였다. 콩 형질전환체를 생산하기 위해 접종을 수행하여 공배양을 하였고 신초를 유도하였다. 신초를 신장시킨 후 뿌리를 유도하였고 흙에서의 순환과정을 거쳐 T₀ 형질전환체를 생산하였다. 이러한 과정을 통하여 현재까지 pB2GW7.0-ATPG10 벡터 적용의 경우 4개체를 생산하였고, pCSEN-ATPG10 벡터 적용의 경우 13개체의 형질전환 식물을 생산하였다.

생산된 T₀ 식물체가 형질전환체인지를 확인하기 위하여 우리는 선별 마커 유전자 *BAR*의 발현으로 인한 PPT 저항성을 가지는지를 식물체의 잎에 PPT painting assay를 수행하였다. 그 결과, 비형질전환체의 잎은 고사하였고, pB2GW7.0-ATPG10과 pCSEN-ATPG10 모두 잎에서 PPT에 대한 저항성을 보였고, 이와 같이 PPT 저항성을 가지는 17개체의 *ATPG10* 콩 형질전환체의 표현형은 그림 71A와 B에, 그리고 pB2GW7.0-ATPG10 형질전환체로부터 수확한 T₁ 형질전환 종자의 수는 그림 71C에 제시하였다.

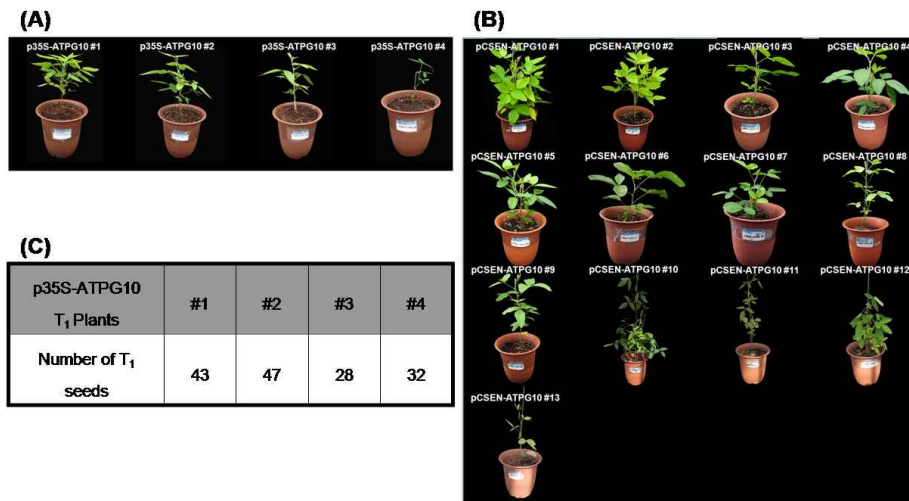


그림 71. pB2GW7.0-ATPG10(A)과 pCSEN-ATPG10(B) 벡터를 도입한 콩 형질전환체의 표현형 및 형질전환체로부터 수확된 T₁ 형질전환 종자 수(C). p35S-: pB2GW7.0-, pSEN-: pCSEN-.

생산된 형질전환체에 대한 유전자 도입을 확인하기 위하여 도입 벡터의 선별 유전자 *BAR*와 도입 유전자 *ATPG10*을 대상으로 PCR을 수행하였다. 형질전환 식물체의 잎을 1 g 정량한 후 액체질소로 얼리고 막자사발에 얼린 잎을 넣고 곱게 갈아 준 후, CTAB 방법을 이용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 도입 유전자인 *ATPG10*과 선발항생제 유전자인 *BAR*의 염기서열을 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, pB2GW7.0-ATPG10 4개체는 *BAR*와 *ATPG10* 유전자의 도입을 확인하였다. 하지만 pCSEN-ATPG10 13개체의 형질전환체에서는 *ATPG10* 유전자는 2, 7, 8, 9, 11, 13번 개체에서 도입이 확인되었고 *BAR* 유전자의 경우 2, 7, 8, 9, 10, 11, 13번 개체에서 도입이 확인되었다. 또한, pB2GW7.0-ATPG10의 삽입 벡터 left border 및 right border 부분을 PCR을 이용하여 증폭한 결과 벡터의 T-DNA의 삽입이 1번 개체의 left border를 제외하고 손상없이 완벽하게 이루어졌음을 확인하였다(그림 72). 현재 유전자 도입 분석을 수행 중에 있으며 추후 RT-PCR을 통하여 유전자 발현을 확인할 예정이다.

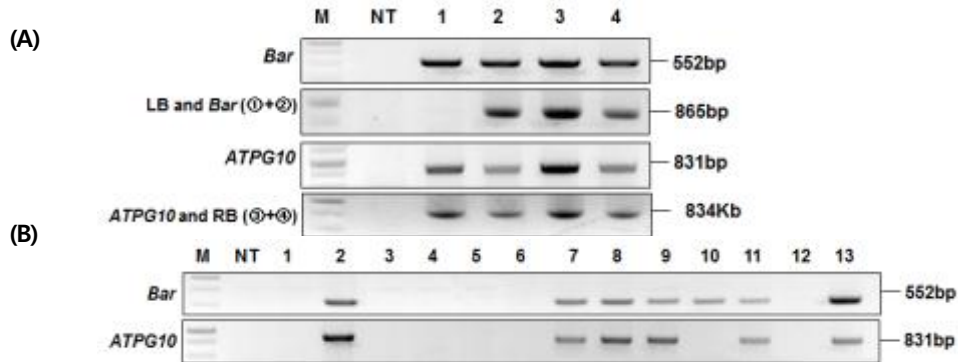


그림 72. PCR을 통한 pB2GW7.0-ATPG10(A)과 pCSEN-ATPG10(B) 콩 형질전환체의 유전자 도입 확인

우리는 pB2GW7.0-ATPG10 4개체의 식물체를 GMO 포장에서 파종하여 농업형질을 조사하였다. 파종하여 PPT painting assay를 수행하였으나, line 1의 경우 3개체, line 3의 경우 1개체만 저항성을 나타내었고, line 2와 4는 고사하였다. 농업형질은 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₂ 종자를 수확하였다. 그 결과 경장이나 마디수, 백립중은 광안콩에 비해 낮은 표현형을 보였으나 line 1, 3 모두 협수 및 총 종자, 종자 무게 등은 광안콩에 비해 높은 수치를 보이는 것을 확인하였다. 식물체들의 협수 및 총 종자 수 등은 광안콩과 비슷하거나 작았으나, 백립중 및 각 종자들의 무게가 광안콩에 비해 높게 나타난 것을 확인하였다(표 28). 이에 pB2GW7.0-ATPG10 형질전환체의 경우 다수성 농업형질에 대한 우량 계통인 것으로 생각되며 추후 세대진전을 통해 농업형질 및 목표형질에 대한 분석을 수행하였다.

표 28. pB2GW7.0-ATPG10 벡터를 이용한 형질전환체의 각 라인별 1차 평균 농업적 특성. p35S-: pB2GW7.0-

2015년도 군위 수확 -p35S-AT10								
	경장	분지수	마디수	협수	총 종자	종자 무게	백립중	
#1-1	43	9	15	319	394	51.19	12.99	
#1-2	54	4	13	172	315	40	12.70	
#1-3	42	9	14	219	326	43.23	13.26	
평균	46.33	7.33	14.00	236.67	345.00	44.81	12.98	
#3-1	44	4	14	137	315	40.4	12.83	
총평균	45.75	6.50	14.00	211.75	337.50	43.71	12.94	

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 16 참조(n=50).

⑦ **MtATPG1-soybean:** 우리는 신규 유전자 *MtATPG1*에 대한 두 종류의 벡터, pB2GW7.0-MtATPG1과 pCSEN-MtATPG1 벡터를 상기의 고효율 콩 형질전환 시스템에 적용하여 콩 형질전환 및 형질전환체 생산을 수행하였다. 이러한 pB2GW7.0-MtATPG1과 pCSEN-MtATPG1 벡터에 대한 콩 형질전환체 생산의 단계별 결과에 대한 그림은 그림 73에 제시하였다. 콩 형질전환체를 생산하기 위해 접종을 수행하여 공배양을 하였고 신초를 유도하였다. 신초를 신장시킨 후 뿌리를 유도하였고 흙에서의 순환과정을 거쳐 T₀ 형질전환체를 생산

하였다.

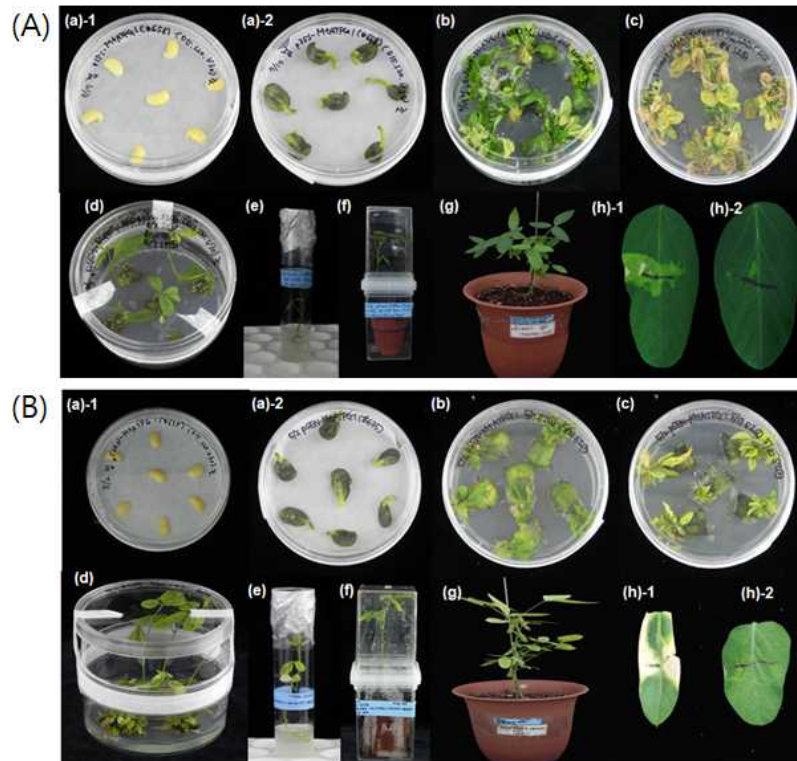


그림 73. pB2GW7.0-MtATPG1(A)과 pCSEN-MtATPG1(B) 벡터를 이용한 콩 형질전환체 생산 과정. (a) Half seed explants on CCM, 1-after infection, 2-after 5 days inoculation, (b) Shoot induction medium without PPT, (c) Shoot induction medium containing PPT 10 mg/L for bar selection, (d) Shoot elongation medium containing PPT 5 mg/L, (e) Rooting, (f) Acclimated putative transgenic plant in a small pot, (g) transgenic plants in a big pot, and (h) PPT leaf painting, 1-non-transgenic plant (sensitive), 2-transgenic plant (resistance).

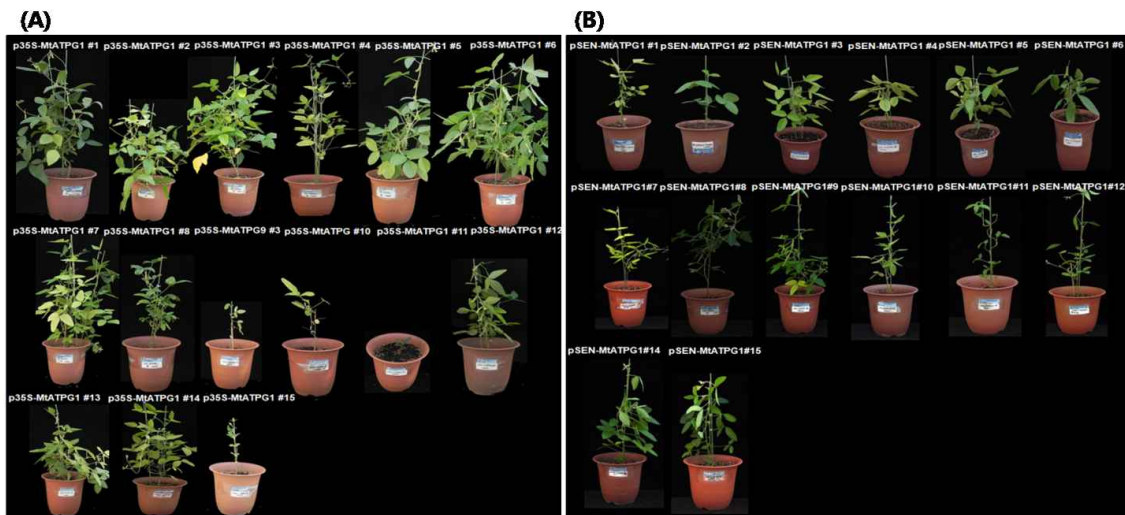


그림 74. pB2GW7.0-MtATPG1(A)과 pCSEN-MtATPG1(B) 벡터를 도입한 콩 형질전환체의 표현형. p35S-: pB2GW7.0-, pSEN-: pCSEN-.

이러한 과정을 통하여 현재까지 pB2GW7.0-MtATPG1 벡터 적용의 경우 Large pot 단계에서 충해를 받아 고사하여 다시 형질전환체 생산을 수행하여 총 15개체의 형질전환체를 생산하였다. pCSEN-MtATPG1 벡터 적용의 경우 15개체의 형질전환 식물체를 생산하였고, 표현형은 그림 74에 제시하였다. 생산된 T₀ 식물체가 형질전환체인지를 확인하기 위하여 우리는 선별 마커 유전자 *BAR*의 발현으로 인한 PPT 저항성을 가지는지를 식물체의 잎에 PPT painting assay를 수행하였다. 그 결과, 비형질전환체의 잎은 고사하였고, pB2GW7.0-MtATPG1과 pCSEN-MtATPG1 모두 잎에서 PPT에 대한 저항성을 보였다.

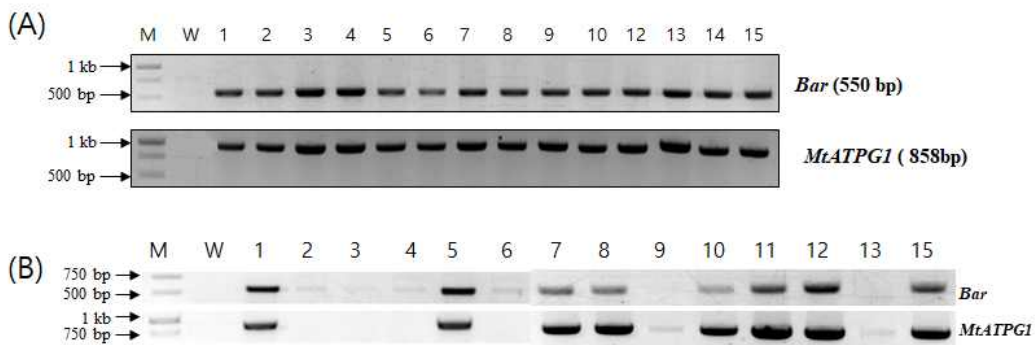


그림 75. PCR을 통한 *pB2GW7.0-MtATPG1*(A)과 *pCSEN-MtATPG1*(B) 콩 형질전환체의 유전자 도입 확인

생산된 형질전환체에 대한 유전자 도입을 확인하기 위하여 도입 벡터의 선별 유전자 *BAR*와 도입 유전자 *MtATPG1*을 대상으로 PCR을 수행하였다. 형질전환 식물체의 잎을 1 g 정량한 후 액체질소로 얼리고 막자사발에 얼린 잎을 넣고 곱게 갈아 준 후, CTAB 방법을 이용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 도입 유전자인 *ATPG10*과 선발항생제 유전자인 *BAR*의 염기서열을 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, pB2GW7.0-MtATPG1의 경우 15개체에서 모두 유전자의 도입을 확인할 수 있었으며, pCSEN-MtATPG1의 경우 잎 상태가 우수했던 14개체를 대상으로 유전자 도입을 확인 한 결과 #1, #5, #7, #8, #10, #11, #12, #15 8개체에서 유전자의 도입을 확인할 수 있었다.(그림 75).

우리는 2 라인의 pCSEN-MtATPG1 식물체를 GMO 포장에서 파종하여 농업형질을 조사하였다. 파종하여 PPT painting assay를 수행하였으나, line 1의 경우 모두 고사하였고, line 3만 저항성을 나타내었다. 농업형질은 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₂ 종자를 수확하였다. 1차 농업적 특성 분석 결과, 경장이나 마디수, 백립중은 광안콩에 비해 낮은 표현형을 보였으나 협수 및 총 종자 수 등은 광안콩에 비해 높은 수치를 보이는 것을 확인하였다(표 29). 이에 pCSEN-MtATPG1 형질전환체의 경우 다수성 농업형질에 대한 우량 계통일 것으로 예상되며 추후 세대진전을 통해 농업형질 및 목표형질에 대한 분석을 다시 수행하였다.



표 29. pCSEN-MtATPG1 벡터를 이용한 형질전환체의 1차 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-

2015년도 군위 수확 -pSEN-MtATPG1							
	결찰	문지수	마디수	형수	총 종자	종자 무게	백립중
#5-1	48	5	13	216	258	25.71	9.97
#5-2	41	4	15	148	158	18.62	11.78
#5-3	51	6	13	250	539	65.36	12.13
#5-4	48	4	11	146	185	18.86	10.19
#5-5	42	2	10	176	390	50.26	12.89
#5-6	52	5	14	147	269	32.37	12.03
#5-7	59	6	14	206	286	35.97	12.58
#5-8	35	5	14	190	170	21.6	12.71
#5-9	49	7	16	207	352	38.41	10.91
#5-10	60	9	19	325	422	62.54	14.82
평균	48.50	5.30	13.90	201.10	302.90	36.97	12.00

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 16 참조(n=50).

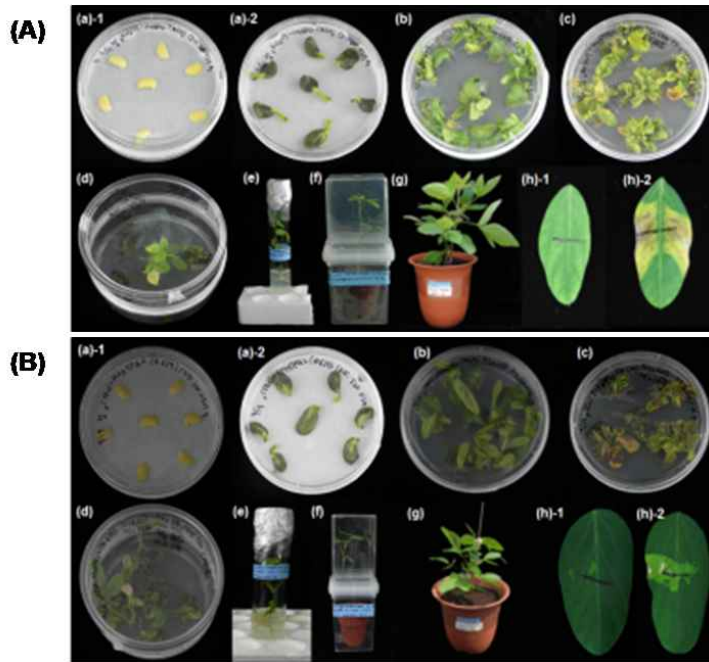
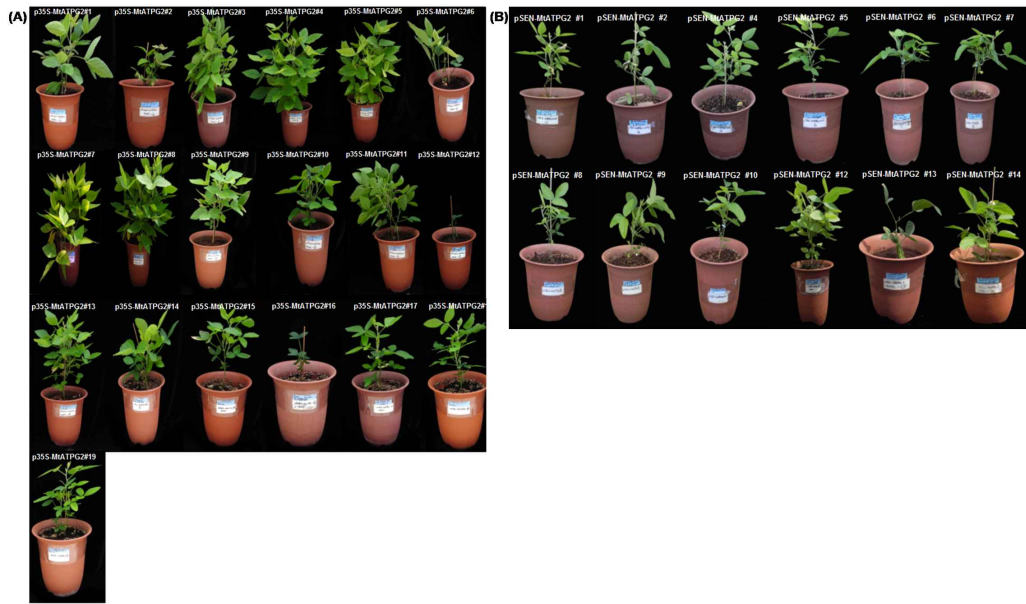


그림 76. pB2GW7.0-MtATPG2(A)와 pCSEN-MtATPG2(B) 벡터를 이용한 콩 형질전환체 생산 과정. (a) Half seed explants on CCM, 1-after infection, 2-after 5 days inoculation, (b) Shoot induction medium without PPT, (c) Shoot induction medium containing PPT 10 mg/L for bar selection, (d) Shoot elongation medium containing PPT 5 mg/L.

⑧ **MtATPG2-soybean:** 우리는 신규 유전자 *MtATPG2*에 대한 두 종류의 벡터, pB2GW7.0-MtATPG2과 pCSEN-MtATPG2 벡터를 상기의 고효율 콩 형질전환 시스템에 적용하여 콩 형질전환 및 형질전환체 생산을 수행하였다. 이러한 pB2GW7.0-MtATPG2와 pCSEN-MtATPG2 벡터에 대한 콩 형질전환체 생산의 단계별 결과에 대한 그림은 그림 76에 제시하였다. 콩 형질전환체를 생산하기 위해 접종을 수행하여 공배양을 하였고 신초를 유도하였다. 신초를 신장시킨 후 뿌리를 유도하였고 흙에서의 순환과정을 거쳐 T₀ 형질전환체를 생산하였다. 이러한 과정을 통하여 현재까지 pB2GW7.0-MtATPG2 벡터 적용의 경우 19개체의 형질전환체를 생산하였고 계속 생산 중에 있다. pCSEN-MtATPG2 벡터 적용의 경우 12개체의 형질전환 식물을 생산하였다.





(C)

T ₁ Plants	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
Number of T ₁ seeds	26	16	23	26	24	70	52	44	59	23	87	7

그림 77. pB2GW7.0-MtATPG2과 pCSEN-MtATPG2 벡터를 도입한 콩 형질전환체의 표현형(A and B) 및 pCSEN-MtATPG2 형질전환체로부터 수확된 T₁ 형질전환 종자 수(C). p35S-: pB2GW7.0-, pSEN-: pCSEN-.

생산된 T₀ 식물체가 형질전환체인지를 확인하기 위하여 우리는 선별 마커 유전자 *BAR*의 발현으로 인한 PPT 저항성을 가지는지를 식물체의 잎에 PPT painting assay를 수행하였다. 그 결과, 비형질전환체의 잎은 고사하였고, pB2GW7.0-MtATPG2과 pCSEN-MtATPG2 모두 잎에서 PPT에 대한 저항성을 보였고, 이와 같이 PPT 저항성을 가지는 31개체의 pB2GW7.0-MtATPG2과 pCSEN-MtATPG2 콩 형질전환체의 표현형은 그림 77A와 B에, 그리고 pCSEN-MtATPG2 형질전환체로부터 수확한 T₁ 형질전환 종자의 수는 그림 77C에 제시하였다.

생산된 형질전환체에 대한 유전자 도입을 확인하기 위하여 도입 벡터의 선별 유전자 *BAR*와 도입 유전자 pB2GW7.0-MtATPG2의 14개체를 대상으로 PCR을 수행하였다. pCSEN-MtATPG2 형질전환 식물체의 경우 층해로 인해 잎을 채취하지 못하여 수행하지 못하여 이후 T₁ 식물체를 생산하여 유전자 도입 유무 및 발현을 확인 할 예정이다. 형질전환 식물체의 잎을 1 g 정량한 후 액체질소로 얼리고 막자사발에 얼린 잎을 넣고 곱게 갈아 준 후, CTAB 방법을 이용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 도입 유전자인 *MtATPG2*와 선발항생제 유전자인 *BAR*의 염기서열을 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, pB2GW7.0-MtATPG2 14개체의 형질전환체의 경우 *MtATPG2*유전자는 1, 2, 4, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14번 개체에서 도입이 확인되었고 *BAR* 유전자는 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14번 개체에서 도입이 확인되었다. 또한, pB2GW7.0-MtATPG2의 삽입 벡터 left border 및 right border 부분을 PCR을 이용

하여 증폭한 결과 left border는 전 형질전환체가 손상없이 완벽하게 도입이 이루어졌음을 확인하였고, right border의 경우 1, 4, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14번 개체에서 도입을 확인하였다(그림 78A). 현재 유전자 도입 분석을 계속해서 수행 중에 있다. 또한 형질전환체로부터 삽입 유전자의 발현을 확인하기 위하여 pB2GW7.0-MtATPG2 형질전환 식물체중 14개체의 잎을 Plant RNA Purification Reagent(invitrogen)를 이용하여 RNA를 분리하였으며, 도입 유전자인 *MtATPG2*과 선발항생제 유전자인 *BAR*의 염기서열을 이용하여 RT-PCR를 수행하였다. 그 결과, *MtATPG2* 유전자의 경우 14개체 중 3번과 8번, 2개체를 제외한 전체에서 발현된 것을 확인하였고 *BAR* 유전자의 경우 8번 개체를 제외하고 발현되는 것을 확인하였다(그림 78B). 추후 pB2GW7.0-MtATPG2의 5개체를 GMO 포장에서 농업형질 조사를 수행하였다.

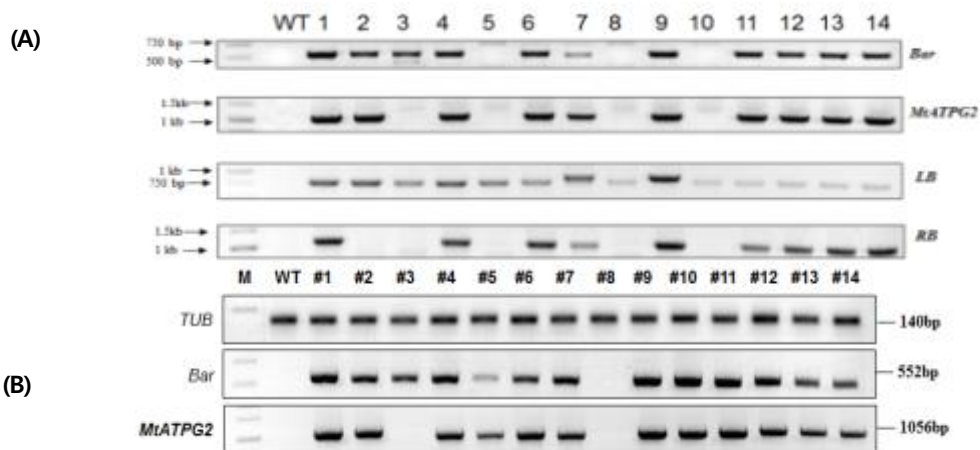


그림 78. PCR과 RT-PCR을 통한 pB2GW7.0-MtATPG2 콩 형질전환체의 유전자 도입(A) 및 유전자 발현(B) 확인.

표 30. pCSEN-MtATPG2 벡터를 이용한 형질전환체의 1차 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-.

2015년도 군위 수확 -pSEN-MtATPG2								
	경장	분지수	마디수	형수	총 종자	종자 무게	백립중	
#7-1	18	3	7	76	156	18.82	12.06	
#8-1	26	4	11	72	48	5.37	11.19	
#8-2	21	3	101	70	108	15.47	14.32	
#8-3	42	6	15	227	264	35.39	13.41	
평균	29.67	4.33	42.33	123.00	140.00	18.74	12.97	
#12-1	45	6	14	219	135	19.6	14.52	
#12-2	31	5	11	83	153	20	13.07	
#12-3	38	8	14	260	324	42.9	13.24	
#12-4	45	6	17	245	333	45.61	13.70	
#12-5	50	8	15	238	241	36.08	14.97	
평균	41.80	6.60	14.20	209.00	237.20	32.84	13.90	
총평균	35.11	5.44	22.78	165.56	195.78	26.58	13.39	

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 16 참조(n=50).

pB2GW7.0-MtATPG2의 경우, T₀ 식물체의 수확시기와 올해 파종시기가 맞지 않아 5차년도에 농업형질을 조사하였으며, pCSEN-MtATPG2의 경우, 12개체의 식물체를 선발하지 못한 상황에서 GMO 포장에서 파종하여 농업형질을 조사하였다. 파종하여 PPT painting assay를 수행

한 결과 line 7에 1개체, line 8에 3개체, line 12에 5개체를 제외한 나머지 식물체들은 모두 고사하였다. 유전자의 도입단계에 있어 손상 되었거나 해충에 의한 충해 및 오갈증으로 인해 위 세 line만 생존한 것으로 예상되어진다. 농업형질은 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₂ 종자를 수확하였다. 1차 농업적 특성 분석 결과, 경장이나 마디수, 백립중 종자량 등 광안콩에 비해 낮은 표현형을 보였다(표 30). 이는 T₀ 식물체 단계에서 충해를 받아 종자의 상태가 건강하지 못해 낮은 농업형질을 보인 것으로 예상하여, 추 후 pCSEN-MtATPG2 내에서 비교하여 선별한 line 7-1, 8-2, 12-3, 12-4을 세대진전을 통해 농업형질 및 목표형질에 대한 분석을 수행하였다.

⑨ **AMTG1-soybean:** 우리는 발굴한 신규 유전자 *AMTG1*에 대한 pCSEN-AMTG1백터를 상기의 고효율 콩 형질전환 시스템에 적용하여 콩 형질전환 및 형질전환체 생산을 수행하고 있으며, 생산된 형질전환체 일부에 대해 도입 유전자에 대한 도입 및 발현 확인 등 형질전환체 1차 기능 연구를 수행하고 있다. 한편 pB2GW7.0 백터의 경우 현재 콩 형질전환용 백터 construct를 제작하고 있는 중이다. 백터 제작이 완료되면 pB2GW7.0 백터에 도입된 신규 유전자를 콩에 형질전환하여 형질전환체를 생산하고자 한다.

⑩ **GmATPGs-soybean:** 우리는 3~4차년도에 신규 발굴중인 9종의 *GmATPGs*에 대한 pCSENIF 백터를 상기 고효율 콩 형질전환 시스템에 적용하여 콩 형질전환 및 형질전환체 생산을 순차적으로 수행하고 있다. 한편 pB2GW7.0 백터의 경우, 일차 백터인 pENTR vector로의 유전자 도입이 완료되어 현재 이를 항시 발현 백터인 pB2GW7.0에 도입을 진행하고 있으며, 제작 완료된 pB2GW7.0 백터는 콩 형질전환 및 형질전환체 생산에 순차적으로 적용할 것이다.

### 3) 생산성 지표 조사를 통한 콩 형질전환체의 농업형질 분석

본 연구팀은 경북 군위에 위치한 형질전환 콩 재배를 위한 GMO 포장에 인가를 받아 2014년 6월에, 그리고 2015년 6월에 다수성 형질을 가지는 우량 콩 형질전환 라인의 종자를 파종하였다. 한 라인당 15cm, 20립씩 파종하였다. 대조군으로 형질전환 원품종인 광안콩을 동일한 시기에 동일한 조건에서 파종하였다. 형질전환체 생성 단계와 순화과정 중에 PPT를 통한 선발과정을 거쳐 완성된 개체들을 세대 진전하여 2차 Basta 처리를 통해 분리비를 보이는 라인을 재선발하였다. 2014년 6월에 파종한 라인들에 대하여 각 유전자당 유전자 도입 및 발현이 확인되고 생산성 지표인 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 비교하여 유전자 기능에 의해 농업형질이 발현되는 것으로 판단되는 라인들은 다음과 같다: p35S-ATPG3-#2-2, pSEN-ATPG3-#1-6, p35S-ATPG4-#9-1, pSEN-ATPG7-#3-16, 그리고 p35S-ATPG8-#1-1. 이러한 우량 형질전환 라인들은 2015년 봄에 재파종하여 포장시험을 수행하였으며, 이러한 포장시험에 대한 간략한 설명은 그림 79에서 제시하였다. 그리고 2015년 6월에 파종한 라인들에 대한 농업형질 분석 결과, 우량 형질전환 라인으로 판단되는 라인들은 다음과 같다: p35S-ATPG3-#1-1, p35S-ATPG7-#3, pSEN-ATPG7-#8-3, 그리고 pSEN-ATPG8-#3 (그림 80).



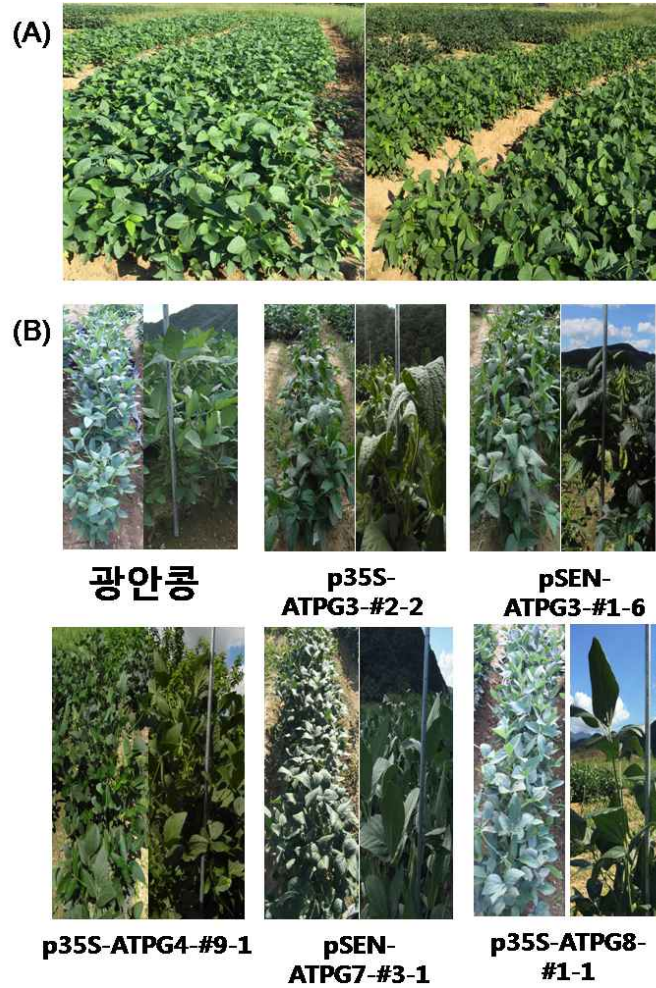


그림 79. 2014년 6월 파종 형질전환 라인들의 GMO 포장 전체적인 사진(A)과 대조군과 비교해 우수한 다수성 형질을 보이는 line들(B)의 포장에서의 표현형. p35S-: pB2GW7.0-, pSEN-: pCSEN-.

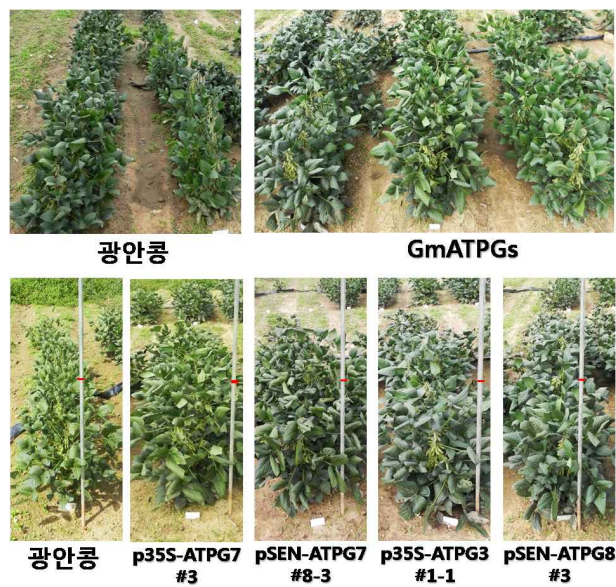


그림 80. 2015년 6월 파종 형질전환 라인들의 GMO 포장 사진(A)과 대조군과 비교해 우수한 다수성 형질을 보이는 line들(B)의 포장에서의 표현형. p35S-: pB2GW7.0-, pSEN-: pCSEN-.

#### 4) 세대 진전을 통한 우량 콩 형질전환체의 농업형질 분석 (I)

우리는 3차년도(2015년)까지 생산된 농업형질의 데이터를 종합하여 우수하다고 판단되어지는 ATPGs line들을 선별하여 2016년도에 경북 군위에 위치한 LMO 포장에서 2~3차 농업형질 분석을 수행하기 위해 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, wild type인 광안콩과 비슷하거나 상대적으로 우수한 형질을 보이는 종자를 수확하였다. 파종 초기 시 군위 지역에 심한 가뭄과 수확시기에 잦은 비 피해로 인해 수확량이 전년도에 비해 크게 저하된 것으로 나타났다.

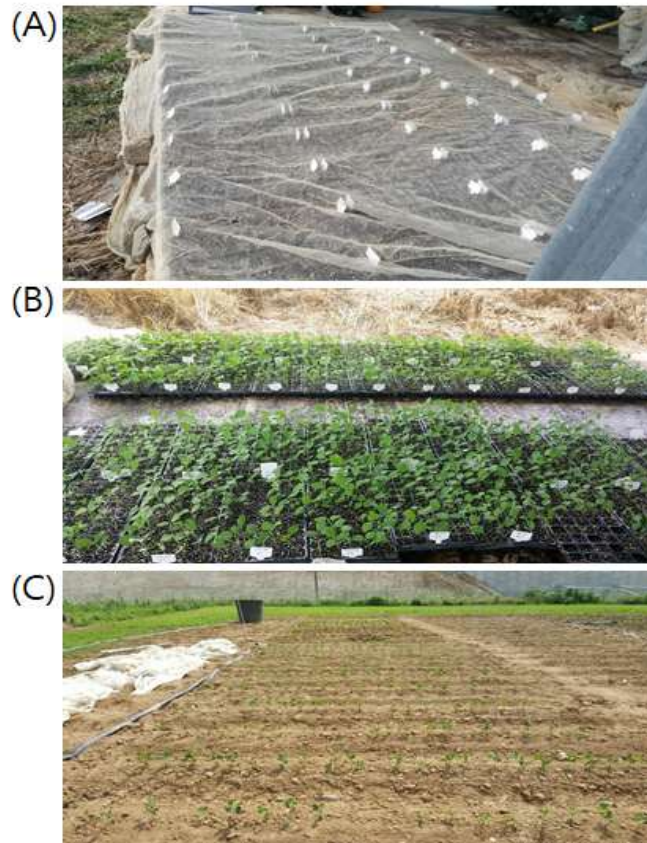


그림 81. 2016년 6월 형질전환 라인들의 육묘판 파종 사진(A)과 1 node에서 PPT 처리 사진(B) 및 포장에 이식한 사진(C).

우리는 6월 중순경에 육묘판에 종자를 파종하여(그림 81A) 2 node가 자라기 시작하는 6월 22일에 PPT 100ppm으로 leaf painting을 처리하였다(그림 81B). 그 후 5일 뒤인 27일경에 저항성을 나타내는 개체를 선별하여 포장에 이식하였다(그림 81C). 그림 82A에서 나타나듯 9월 중간점검의 경우 전체적으로 키는 작으나 광안콩에 비해 우수한 표현형을 나타내었다. 하지만 이식 후 계속 되었던 가뭄과 10월경 수확시기에 잦은 비에 의한 습해로 기장이 짧으며 꼬투리에 곰팡이가 피는 습해를 받아 전년도에 비해 수확량이 크게 저해되는 것을 확인할 수 있었다.(그림 82B)



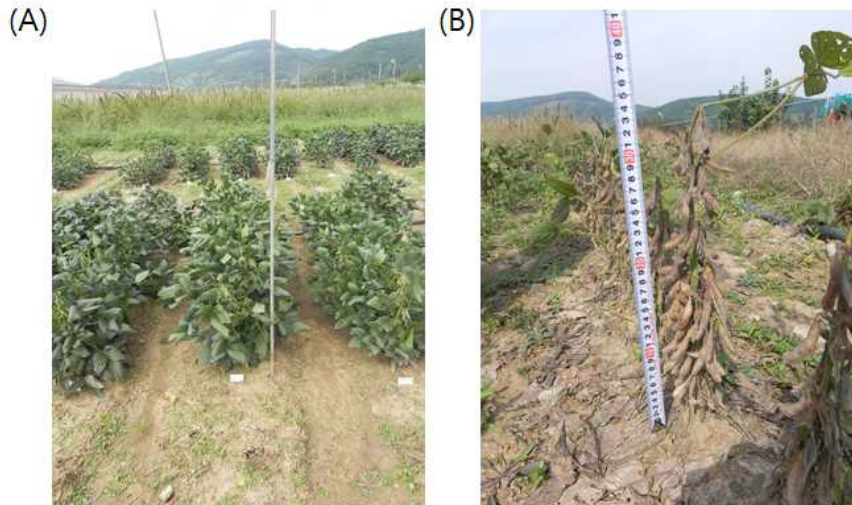


그림 82. 2016년 9월 ATPGs 표현형(A) 및 10월 수확시기의 코투리 표현형(B).

표 31. 농업적 특성 분석(2016년, 군위)에 있어서 광안콩 야생형의 농업적 특성

2016년도 군위 수확 조사-광안콩(WT)							
WT	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	백립중(g)
WT1	45	6	14	52	19	1.98	—
WT2	38	5	12	137	150	23.3	15.53
WT3	40	6	13	74	46	5.38	—
WT4	43	6	14	63	52	5.65	—
WT5	48	7	14	128	146	19.29	13.21
WT6	40	6	13	42	20	2.52	—
WT7	41	5	12	83	97	11.96	—
WT8	42	5	11	51	49	6.6	—
WT9	42	6	13	92	93	12.38	—
WT10	47	6	14	315	186	23.65	12.72
WT11	47	6	14	142	35	3.68	—
WT12	45	4	11	157	89	12.13	—
WT13	47	6	12	78	67	8.97	—
WT14	42	7	13	141	130	17.24	13.26
WT15	40	7	13	182	245	33.9	13.84
WT16	40	7	12	111	78	9.46	—
WT17	37	6	13	135	136	17.9	13.16
WT18	26	5	8	97	90	11.52	—
WT19	46	6	13	135	99	12.25	—
WT20	31	6	13	124	118	14.61	12.38
평균	41.35	5.9	12.6	116.95	97.25	12.7185	—

표 32. pCSEN-ATPG3 벡터를 이용한 형질전환체의 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-

2016년도 군위 수확-pSEN-AT3						
pSEN-AT3	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)
1-1-3-1	33	4	12	118	0	0
1-1-3-3	32	4	12	88	12	1.02
1-1-3-4	26	1	10	29	16	1.59
1-1-3-5	31	3	11	41	0	0
1-4-1-1	19.5	4	7	20	7	0.64
1-4-1-2	26	2	11	22	2	0.21
1-4-1-6	23	1	11	19	3	0.3
1-4-1-7	26	2	11	71	37	2.75

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 31 참조(n=20).

ATPGs 유전자를 이용한 콩 형질전환체의 농업형질 조사는 콩 형질전환 실험의 재료로 이용된 광안콩을 대조군으로 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 종자 수, 백립중(g), 총중량(g)을 비교분석하였으며, 광안콩의 농업형질은 표 31에 제시하였다.

pB2GW7.0-ATPG3 벡터를 적용한 콩 형질전환체 #1-1-1, #1-7-2, #2-1-4, #2-2-4 4라인으로부터 3차 농업형질을 조사하고자 하였으나, 2 node에서 PPT 선발을 거치면서 대부분이 고사하고 이식 시기의 가뭄과 수확시기의 비 피해로 인해 모두 고사하였다. pCSEN-ATPG3 벡터를 적용한 콩 형질전환체의 경우 이전 세대에서 우수했던 #1-1-3, #1-4-1, #3-1-1, #3-7-4와 같은 4 line을 조사한 결과 역시 pB2GW7.0-ATPG3 line들과 비슷한 양상을 보였으며 wild type인 광안콩에 비해 낮은 표현형 및 수확량을 나타냈다.(표 32). 이에 ATPG3 유전자의 경우 세대진전을 하지 않았다.

표 33. pB2GW7.0-ATPG4 벡터를 이용한 형질전환체의 각 라인별 농업적 특성. p35S-: pB2GW7.0-

2016년도 균위 수확 p35S-ATPG4													
p35S-AT4	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	p35S-AT4	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)
8-4-7-1	36	5	13	83	66	6.98	19-2-1-1	33	6	13	19	31	3.57
8-4-7-2	29	5	11	32	46	5.14	19-2-1-2	32	4	14	20	17	2.16
8-4-7-3	33	6	15	75	52	5.26	19-2-1-3	36	4	12	81	93	11.62
8-4-7-4	38	8	15	86	61	6.78	19-2-1-4	29.5	4	12	25	28	3.37
8-4-7-5	32	4	13	21	25	2.96	19-2-1-5	32	5	12	38	48	5.88
8-4-7-6	35	6	14	78	65	7.55	19-2-1-6	36	7	12	67	77	8.78
8-4-7-7	29	6	10	62	64	7.21	19-2-1-7	32	7	12	46	41	5.03
8-4-7-8	29	6	14	34	24	2.56	19-2-1-8	25	5	11	48	44	5.13
8-4-7-9	35	6	14	67	47	5.1	19-2-1-9	36	6	13	48	67	8.23
9-2-2-1	45	6	15	135	79	9.26	19-2-1-10	38	6	12	91	116	14.94
9-2-2-2	42	7	14	167	190	23.05	19-2-1-12	39	8	12	50	64	7.36
9-2-2-3	44	7	15	120	104	12.6	19-2-1-12	39	7	12	44	44	5.11
11-6-7-1	38	6	12	89	88	10.24	19-2-1-13	39	7	16	66	79	9.8
11-6-7-2	38	4	11	85	87	9.8	19-2-1-14	31	5	13	34	38	4.18
11-6-7-3	35	4	12	54	53	6	23-1-2-1	38	6	11	157	307	39
11-6-7-4	25	4	12	51	61	6.46	23-1-2-2	38	6	11	146	93	10.9
11-6-7-5	27	3	11	62	53	5.64	23-1-2-3	25	4	9	38	60	7.26
11-6-7-6	35	6	13	164	121	14.89	23-1-2-4	32.5	2	10	30	28	3.3
12-4-6-1	36	4	12	24	37	3.54	23-1-2-5	33	1	10	34	38	4.71
12-4-6-2	35	6	11	51	72	9.12	23-1-2-6	33	2	10	84	70	8.15
12-4-6-3	37	4	12	39	54	6.27	23-1-2-7	36	0	10	31	49	5.84
12-4-6-4	26	6	7	25	40	4.93	23-1-2-8	32	2	9	42	29	3.34
12-4-6-5	40	4	11	40	61	7.08	23-1-2-9	34	3	11	54	29	3.62
12-4-6-6	35	4	13	29	42	3.86	23-1-2-10	40	3	10	56	16	1.88
12-4-6-7	35	6	12	140	48	4.73	23-1-2-11	24.5	2	9	44	62	7.4
12-4-6-8	36	6	12	43	58	5.5	23-1-2-12	34	1	11	47	51	5.42
12-4-6-9	37	4	11	21	32	3.48							

광안콩 대조군에 대한 농업형질 분석 자료는 표 31 참조(n=20).

2차 농업형질 분석에서 우수했던 10 line들 중 PPT 선발을 거쳐 살아남은 #8-4-7, #9-2-2, #11-6-7, #12-4-6, #19-2-1, #23-1-2 6 line을 대상으로 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₄ 종자를 수확하였다. pB2GW7.0-ATPG4 벡터를 적용한 콩 형질전환체로부터 3차 농업형질을 조사한 결과, 전체적으로 다양한 표현형 변이를 보였는데 경장, 분지수, 마디수, 협수, 백립중 및 총중량은 wild type인 광안콩과 비슷한 경향을 보이거나 개체당 수량이 현저하게 떨어졌다. 그러나 #9-2-2-1, #9-2-2-2, #9-2-2-3, #11-6-7-6, #12-4-6-7, #19-2-1-10, #23-1-2-1 7개체가 수량이 높게 나타났다(표 33). 개체당 수량이 떨어진 식물체들은 도복이 되었으며 심한 습해에 의한 피해가 발생되었다고 판단되어 진다. GMO 포장에서의 농업형질에 대한 조사를 토대로 우리는 pB2GW7.0-ATPG4에서 종자의 상태가 양호하며, 수량성

이 높은 #9-2-2와 #23-1-2-1을 우수한 line으로 선별하여 GMO 포장에 추가 파종을 실시하였다(표 33).

표 34. pCSEN-ATPG6 벡터를 이용한 형질전환체의 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-

2016년도 군위 수확-pSEN-ATPG6						
pSEN-AT6	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)
1-1	36	5	12	87	143	18.4
1-2	38	5	12	152	165	22.14
1-3	34	3	12	68	99	11.15
1-4	35	6	12	140	127	15.7
1-5	35	4	13	134	161	20.01
1-6	36.5	5	11	119	123	17.68
1-7	34	4	12	106	120	15.62
1-8	35	4	12	125	177	22.77
1-9	29	2	11	56	58	7.25

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 19 참조(n=20).

2016년도까지 최종생산 되었던 pCSEN-ATPG6 벡터를 적용한 콩 형질전환체 10개 중 RT-PCR을 통해 유전자의 발현이 확인되었던 #1, #3 line을 대상으로 1차 농업형질을 조사하였다. #3 line의 경우 2 node에서 PPT 선발을 거치면서 대부분이 고사하고 이식 시기의 가뭄과 수확시기의 비 피해로 인해 모두 고사하였다. 하지만 #1 line의 경우 전체적으로 광안콩에 비해 기장이나 분지수, 마디수는 적으나 협수 및 수량성이 우수한 것을 확인할 수 있었다(표 34). 이에 우리는 수량성이 가장 우수한 #1-8을 추가로 농업형질 조사를 실시하였다.

표 35. pB2GW7.0-ATPG7 벡터를 이용한 형질전환체의 각 라인별 농업적 특성. p35S-: pB2GW7.0-

2016년도 군위 수확-p35S-ATPG7													
p35S-AT7	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	p35S-AT7	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)
1-4-1	42	4	13	210	154	19.59	18-1	30	5	11	51	54	6.07
1-4-2	39	5	12	146	118	15.17	18-2	24	5	10	47	60	6.64
1-4-3	45	3	11	60	59	6.25	18-3	32	6	12	71	82	10
1-4-4	40	5	12	120	144	16.23	18-4	31	5	12	55	60	7.41
1-4-5	43	5	13	139	136	18.71	18-5	32	5	12	50	68	8.15
1-4-8	39	5	11	86	111	10.26	18-6	25	4	9	51	56	6.99
3-4-1	44	9	13	191	135	15.46	18-7	31	4	12	25	26	3.4
3-4-2	41	6	12	149	113	11.75	18-8	31	5	11	93	107	13.26
3-4-3	43	7	12	130	174	19.88	18-9	31	5	11	54	65	7.93
3-4-4	49	4	13	102	78	8.7	18-10	32	5	12	57	85	9.65
3-4-5	48	7	13	87	119	15.19	18-11	26	3	11	57	64	8.07
3-4-6	45	6	13	123	138	16.02	18-12	32	5	12	36	33	3.35
3-4-7	48	6	13	233	79	10.64	18-13	32	5	13	54	61	7.89
3-4-8	41	6	9	167	103	10.97	18-14	34	6	14	75	88	11.2
3-4-9	35	6	11	160	144	19.62	18-15	30	5	12	24	39	5.11
3-4-10	47	6	13	166	57	8.81	18-16	29	5	12	26	22	2.8
3-4-11	44	6	14	181	145	18.05	18-17	33	6	12	83	93	10.86
							19-2	28	5	11	82	71	8.93

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 31 참조(n=20).

1차 농업형질 분석에서 우수했던 #1-4, #3-4, #4-1 3 line과 새로 생성된 형질전환체들 중 종자의 수량 및 상태가 우수하고 파종시기에 수확이 가능했던 #7, #8, #9, #15, #18, #19 6 line을 포함하여 총 9 line을 대상으로 PPT 선발을 수행하였다. 그 결과 살아남은 #1-4, #3-4, #18, #19 4 line을 대상으로 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였다. 이 때 그림 60의 PCR 결과처럼 #7, #8, #9, #15가 고사하여 PPT assay에 대한 신뢰



도를 한번 더 확인 할 수 있었다. pB2GW7.0-ATPG7 벡터를 적용한 콩 형질전환체로부터 2차 농업형질을 조사한 결과, 전체적으로 다양한 표현형 변이를 보였는데 특히 #1-4, #3-4 2 line의 경우 경장, 분지수, 마디수, 협수, 백립중 및 총중량은 wild type인 광안콩과 비슷한 경향을 보이거나 높은 수량을 나타내었다. 그러나 #18, #19 2 line의 경우 광안콩에 비해 수량이 낮게 나타났다고(표 35). 이 결과를 바탕으로 우리는 pB2GW7.0-ATPG7에서 종자의 상태가 양호하며, 수량성이 높은 #1-4-1, #3-4-3을 우수한 line으로 선별하여 GMO 포장에 추가 파종을 실시하였다.

표 36. pCSEN-ATPG7 벡터를 이용한 형질전환체의 각 라인별 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-

2019년도 대조구 pCSEN-ATPG7													
pSEN-AT7	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	pSEN-AT7	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)
3-1-3-1	35	7	13	72	89	10.09	7-7-6-1	39	4	11	180	213	2.76
3-1-3-2	38	7	13	97	81	9.43	7-7-6-2	30	7	10	218	269	38.65
3-1-3-3	28	4	11	94	95	9.18	7-7-6-3	44	6	11	111	257	31.42
3-1-3-4	30	5	13	97	158	19.32	7-7-6-4	32	6	9	125	182	24.21
3-1-3-5	32	5	13	70	102	11.45	7-7-6-5	23	2	7	49	42	4.09
3-1-3-6	34	7	13	67	95	10.25	7-7-6-7	36	4	11	187	252	32.55
3-1-3-7	34	7	12	102	130	0.13	8-2-9-1	38	6	12	155	169	20.84
3-1-3-8	30	4	13	42	43	0.03	8-2-9-2	48	6	12	142	167	21.31
3-1-3-9	36	7	13	66	71	0.07	8-2-9-3	46	5	12	115	123	15.87
3-1-3-10	30	5	12	130	168	20.94	8-2-9-4	45	6	13	184	196	25.68
3-1-3-11	39	7	13	79	87	9.93	8-2-9-5	41	5	12	102	98	12.65
3-1-3-12	26	5	12	28	41	5.03	8-2-9-6	45	5	12	175	143	20.08
3-1-3-13	31	6	13	34	40	4.3	8-2-9-7	48	7	13	129	137	1.69
3-1-3-14	37	6	14	52	83	9.5	8-2-9-8	43	5	13	73	87	9.58
3-6-6-1	30	4	10	90	101	11.8	8-2-9-9	41	4	10	84	101	12.65
3-6-6-2	37	4	12	143	128	15.26	8-2-9-10	38	5	13	129	129	16.75
3-6-6-3	43	5	12	170	179	23.63	8-3-3-1	40	8	13	139	105	13.55
3-6-6-4	38	3	12	114	94	0.11	8-3-3-2	50	6	14	197	161	20.96
3-6-6-5	39	4	12	134	170	20.93	8-3-3-3	46	6	11	119	110	15.14
3-6-6-6	39	8	13	189	278	36.12	8-3-3-4	34	4	11	66	61	6.91
3-6-6-7	26	4	10	76	84	11.54	8-3-3-5	43	5	13	151	131	0.16
3-6-6-8	37	4	11	55	90	10.45	8-3-3-6	44	7	13	144	132	16.88
3-6-6-9	29	4	11	79	94	11.57	8-3-3-7	44	4	13	221	182	25.19
3-6-6-10	35	4	13	63	100	11.9	8-3-3-8	43	6	13	132	122	1.48
6-2-9-1	44	5	14	343	212	29.12	8-3-3-9	52	6	12	172	187	23.37
6-2-9-2	42.5	6	12	231	245	0.27	8-3-3-10	42	7	13	210	246	31.73
6-2-9-3	25	3	8	77	122	15.45	8-3-3-11	54	7	14	238	192	23.35
6-5-6-1	43	6	13	159	112	14.68	8-3-3-12	46	6	13	193	198	26.89
6-5-6-2	43	5	12	157	159	20.16	8-3-3-13	26	3	10	82	154	19.19
6-5-6-3	38	7	13	160	291	38.68	8-3-3-14	26	3	8	109	134	16.79
6-5-6-4	44	6	12	197	214	29.3	pSEN-AT7	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)
6-5-6-5	36	6	12	148	120	14.91	23-1	45	6	13	159	203	31.18
6-5-6-6	34	5	11	97	117	17.57	23-2	39	7	10	96	46	5.97
6-5-6-7	34	5	9	156	78	10.5	23-3	39	4	11	110	105	1.12
6-5-6-8	41	6	13	148	176	23.62	23-4	39	7	12	117	105	14.39
6-5-6-9	29	6	10	138	191	27.37	23-5	42	6	13	184	90	11.38
6-5-6-10	43.5	6	12	109	253	30.12	23-7	42	6	13	127	138	16.62
6-5-6-11	31	6	10	87	107	14.87	23-8	32	6	9	132	121	15.64
7-1-1-1	27	4	10	141	172	20.3	23-9	44	6	13	160	123	15.63
7-1-1-2	43	5	12	178	106	13.98							
7-1-1-3	38	5	12	164	112	14.82							
7-1-1-4	44	4	13	114	214	27.56							
7-1-1-5	37	6	11	140	85	10.91							
7-1-1-6	41	6	12	84	168	21.2							

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 31 참조(n=20).

pCSEN-ATPG7 벡터를 적용한 콩 형질전환체의 경우 이전 세대에서 우수했던 #3-1-3, #3-6-6, #6-2-9, #6-5-6, #7-1-1, #7-7-6, #8-2-9, #8-3-3 line과 새로 생산된 형질전환체 #11~#16, #18~#26, #28, 총 16 line을 파종하였다. 새로 생산된 형질전환체의 경우 파종 후에 PCR 및 RT-PCR을 수행하였는데, PPT assay와 유사하게 #14, #21, #23 3 line이 선발되어 포장에 이식하였으나 #23만 생존하고, #14, #21은 가뭄 및 습해에 의해 모두 고사하였다. 3차 농업형질을 조사한 결과 pCSEN-ATPG7의 경우 wild type인 광안콩에 비해 전체적으로 우수한 수량 및 표현형을 보였다. 특히 ##6-2-9, #6-5-6, #7-7-6, #8-3-3 #23 5 line의 경우 광안콩에 비해 상당히 우수한 표현형 및 수량성을 보였다. 따라서 이 라인들을 추가 파종하여 최종 우수계통으로 선별하고자 하였다(표 36).

표 37. pB2GW7.0-ATPG8 벡터를 이용한 형질전환체의 각 라인별 평균 농업적 특성. p35S-: pB2GW7.0-

2016년도 균위 수확-p35S-ATPG8						
p35S-AT8	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)
1-4-1-1	35.5	5	13	141	125	16.28
1-4-1-2	29	4	11	52	44	5.38
1-4-1-3	31	4	11	31	28	3.21
1-4-1-4	29	4	10	36	37	3.75
1-4-1-5	37	6	13	136	130	15.6
1-4-1-6	40.5	6	16	151	121	15.83
1-5-6-1	30	4	13	75	96	12.21
1-5-6-2	28	5	11	32	47	6.93
1-5-6-3	32	6	12	32	45	5.33
1-5-6-4	35	8	13	38	62	9.12
1-5-6-5	30	7	14	43	50	7.14
2-1-1-1	38	5	12	47	56	7.09
2-1-1-2	36	4	11	78	85	11.88
2-1-1-3	36	6	15	59	97	12.09
2-1-1-4	31	4	11	49	76	9.09
2-1-1-5	35	5	13	73	101	12.72
2-1-1-6	30	3	11	50	76	7.98
2-1-1-7	20	3	9	28	43	5.25
2-1-1-8	34	6	12	43	57	8.16
2-1-1-9	27	2	10	10	11	1.43
2-1-1-10	23	3	10	16	34	4.07

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 31 참조(n=20).

2차 농업형질 분석에서 우수했던 pB2GW7.0-ATPG8 벡터를 적용한 콩 형질전환체 #1-4-1, #1-5-6, #2-1-1 3 line을 대상으로 PPT 선발을 수행한 후 포장에 이식하였다. 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, 그 결과 1-5-6의 경우 wild type 보다 수량 및 표현형이 좋지 못하였다. 그러나 #1-4-1, #2-1-1의 경우 편차가 심하지만 광안콩과 비슷하거나 상대적으로 높은 수량을 보이는 개체들이 있어 #1-4-1-1, #2-1-1-5 2개체를 추가로 세대진전하여 농업형질 조사를 결정하였다(표 37).

표 38. pCSEN-ATPG8 벡터를 이용한 형질전환체의 각 라인별 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-

2016년도 균위 수확-pSEN-ATPG8						
pSEN-AT8	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)
3-9-1	31	3	11	107	142	14.48
3-9-2	25	1	9	40	51	5.45
3-9-3	30	4	12	123	141	15.98
10-1	22	4	11	41	58	6.03
10-2	19	2	12	9	9	1.29
10-3	18	4	8	56	114	11.82
10-4	18	2	11	14	12	0.92
10-5	20	2	11	14	21	2.66
10-6	24	4	14	25	24	2.3
10-7	20	0	11	14	5	0.47
10-8	25	5	12	35	26	2.72

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 31 참조(n=20).



pCSEN-ATPG8 벡터를 적용한 콩 형질전환체의 경우 이전 세대에서 우수했던 #3-2, #3-9 2 line과 새로 생산된 형질전환체 #9, #10, #11 3line, 총 5 line을 육묘판에 파종하여 PPT assay 를 수행하였다. 그 결과 #3-2, #9, #11은 고사하고, #3-9, #10 2 line만 선발되었다. 농업형질을 조사한 결과 pCSEN-ATPG8의 경우 wild type인 광안콩에 비해 전체적으로 비슷하거나 낮은 수확량을 보였다. 하지만 종자 상태가 우수한 2 line을 선별하여 최종 농업형질을 검정하고자 하였다(표 38).

표 39. pCSEN-ATPG10 벡터를 이용한 형질전환체의 각 라인별 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-

2016년도 군위 수확-pSEN-ATPG10													
pSEN-AT10	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	pSEN-AT10	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)
2-1	39	4	15	51	45	6.01	8-1	35	4	12	87	96	13.65
2-2	32.5	7	12	73	121	15.6	8-2	40.5	6	13	74	66	7.95
2-4	36	7	12	98	110	12.3	8-3	43	4	13	157	187	25.73
2-5	37	5	12	34	45	4.86	8-4	43	3	13	56	49	6.13
2-6	35	5	13	50	58	6.29	8-5	40	4	12	71	70	8.26
2-7	24	3	10	62	88	11.24	8-6	50	5	12	33	10	1.03
2-8	36.5	3	12	51	52	6.47	8-7	30	5	11	61	66	8.5
2-9	42	5	13	30	27	3.45	9-1	46	7	13	125	188	25.78
2-10	33	5	13	68	103	14.15	9-2	27	2	12	28	36	5.46
2-11	31	5	13	21	15	1.76	9-3	37	1	14	75	109	12.21
2-12	41	4	12	60	81	12.06	9-4	35	2	13	83	135	19.97
2-13	32	7	15	47	83	9.75	9-5	42	4	14	78	120	16.26
2-14	15	4	9	36	42	5.03	9-6	41	4	13	56	53	6.54
							9-7	44	5	12	89	102	14.57
							9-8	50	2	14	27	27	2.86

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 31 참조(n=20).

pB2GW7.0-ATPG10 벡터를 적용한 콩 형질전환체의 1차 농업형질 분석에서 우수했던 #1-1, #1-3, #3-1 3 line을 PPT assay 후 포장에 이식하였으나 초기 가뭄 피해로 모두 고사하였다. pCSEN-ATPG10 벡터를 이용하여 새로 생산한 ATPG10 형질전환체 #1, #2, #3, #4, #5, #8, #9, #10, #12 9개체를 파종하여 PPT assay를 수행하였다. 그 결과 PCR에서의 결과와 같이 #2, #8, #9 3 line만 생존하여 농업형질을 조사 할 수 있었다. 농업형질을 조사한 결과 pCSEN-ATPG10의 경우 wild type인 광안콩에 비해 전체적으로 비슷한 표현형을 보였으나, #8-3, #9-1 2 line의 경우 광안콩에 비해 상당히 우수한 표현형 및 수량성을 보여 추가 파종을 실시하여 최종 line을 선별하고자 하였다(표 39).

표 40. pB2GW7.0-MtATPG1 벡터를 이용한 형질전환체의 농업적 특성. p35S-: pB2GW7.0-

2016년도 군위 수확-p35S-MtATPG1						
p35S-Mt1	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)
12-1	39	9	12	218	190	25.89
12-2	27	6	12	65	77	9.21
12-3	37	8	12	161	157	21.45
12-4	35	6	12	160	188	23.55
12-5	30	7	13	180	171	22.23

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 31 참조(n=20).

우리는 pB2GW7.0-MtATPG1 벡터를 적용한 콩 형질전환체로부터 종자의 수량 및 상태가 우수하고 파종시기에 수확이 가능했던 #1, #2, #3, #4, #6, #7, #12, #13, #19 9 line을 대상으로 PPT 선별을 수행하였다. 그 결과 #4은 PPT분석에서 고사하여 8 line을 이식하였으나 가뭄

과 습해로 인해 #12 라인만 생존하여 #12라인을 대상으로 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였다. pB2GW7.0-MtATPG1 벡터를 적용한 콩 형질전환체로부터 첫 농업형질을 조사한 결과, 전체적으로 wild type인 광안콩에 비해 높은 수량을 나타내었다. 이에 본 연구실에서는 종자 상태가 양호하고 수량성이 좋았던 #12-1, #12-3 2 line을 선별하여 GMO 포장에 추가 포장검정을 실시하였다(표 40).

표 41. pCSEN-MtATPG1 벡터를 이용한 형질전환체의 각 라인별 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-

2016년도 균위 수확-pSEN-MtATPG1						
pSEN-Mt1	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)
5-10-1	39	4	15	90	58	4.82
5-10-2	42	3	15	87	31	3.91
5-10-3	44	6	16	85	83	8.39
5-10-4	41	4	14	68	54	6.22
5-10-5	43	7	15	120	56	0.11
5-10-6	45	7	17	118	84	0.09
5-10-7	43	6	14	259	239	36.81
5-10-8	45	5	12	173	148	17.48
5-10-9	44	7	16	102	119	13.61
5-10-10	39	5	15	48	41	4.5
5-10-13	36	4	15	93	78	8.92
5-10-14	41	5	16	99	115	11.9
5-10-15	47	8	16	193	114	12.69
5-10-16	42	6	15	120	114	13.77
7-2	40	4	12	43	20	2.53
7-3	31	5	12	42	46	4.37
7-4	38	4	12	29	27	2.84
7-5	44	8	16	191	151	20.14
7-6	37	4	11	32	14	1.5
12-1	34	7	11	125	141	19.89
12-2	33	7	12	168	182	24.91

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 31 참조(n=20).

pCSEN-MtATPG1 벡터를 적용한 콩 형질전환체의 경우 이전 세대에서 우수했던 #5-10 line 과 새로 생산된 형질전환체 #7, #8, #10, #12, #15 5 line을 파종하였다. 새로 생산된 형질전환체의 경우 #10을 제외한 나머지 line들을 포장에 이식할 수 있었으나, #5-10, #7, #12 3 line만 생존하고, #8, #15는 가뭄 및 습해에 의해 모두 고사하였다. 2차 농업형질을 조사한 결과 pCSEN-MtATPG1의 경우 wild type인 광안콩에 비해 전체적으로 비슷한 경향을 나타내었으며, #12 line의 경우 광안콩보다 우수한 수량을 나타내었다. 하지만 종자의 상태가 습해로 인한 곰팡이가 심해 후대 농업형질 검정은 수행하지 않았다(표 41).

우리는 pB2GW7.0-MtATPG2 벡터를 적용한 콩 형질전환체로부터 종자의 수량 및 상태가 우수하고 파종시기에 수확이 가능했던 #1, #4, #7, #9, #11, #13, #14, #15, #17, #18, #19, #20 12 line을 대상으로 PPT 선발을 수행하였다. 그 결과 모든 line이 저항성을 나타내어 이식하였으나 가뭄과 습해로 인해 #7, #13, #14, #17, #20 5 라인이 고사하였다. 생존한 7 라인을 대상으로 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였다. 그 결과 pB2GW7.0-MtATPG2 벡터를 적용한 콩 형질전환체로부터 첫 농업형질을 조사한 결과, #11, #18, #19 3라인이 대조군인 광안콩에 비해 상대적으로 비슷하거나 수량성이 적은 것을 확인할 수 있었다. 하지만 #9-7과 #11-5 2라인의 경우 광안콩에 비해 상당히 높은 수확량을 보여

다음세대로 진전하여 최종 농업형질을 조사하였다(표 42). 그러나 pCSEN-MtATPG2 벡터를 적용한 콩 형질전환체의 경우 1차 농업형질 조사에서 우수한 수량성과 표현형을 나타내었던 #7-1, #8-2, #12-3, #12-4 4라인 모두 PPT assay에서 저항성을 나타내서 포장에 이식하였으나 가뭄과 습해 등 많은 환경스트레스로 인해 모두 고사하여 추가 포장검정을 수행할 수 없었다.

표 42. pB2GW7.0-MtATPG2 벡터를 이용한 형질전환체의 각 라인별 평균 농업적 특성. p35S-: pB2GW7.0-

2016년도 군위 수확 p35S-MtATPG2													
p35S-Mt2	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	p35S-Mt2	경장(Cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)
1-1	40	5	12	143	133	16.26	11-9	36	5	13	57	53	5.9
1-2	38	6	13	114	140	17.03	11-10	43	8	16	115	135	17.43
1-3	34	4	11	121	130	15.8	11-11	37	7	14	53	51	5.54
1-4	35	4	12	98	131	16.92	11-12	38	7	16	74	34	3.83
1-5	40.5	5	13	159	139	18.3	11-13	34	6	14	70	63	7.58
1-6	38	6	12	137	114	18.03	11-14	43	7	16	159	162	19.82
1-7	36	5	12	117	146	18.6	11-15	39	6	15	124	62	6.87
1-8	34	4	12	189	174	22.05	15-1	30	5	11	86	42	4.63
1-9	36	4	12	91	119	15.05	15-2	35	5	11	187	86	11.26
1-10	25	6	9	109	96	12.2	15-3	34	6	10	162	116	16.15
4-1	39	7	12	83	98	12.77	15-4	34	7	13	140	51	6.98
4-2	36	8	12	55	90	10.1	15-5	31	5	11	70	96	10.96
4-3	42	6	12	103	147	18.16	15-6	37	7	14	89	87	11.41
4-4	32	6	12	21	111	17.94	15-7	31	7	14	53	62	7.11
4-5	36	9	12	102	120	15.1	15-8	19	5	9	58	74	8.31
4-6	36.5	7	12	131	181	21.42	15-9	32	6	11	40	58	4.97
4-7	36	8	12	164	141	17.94	15-10	31	4	13	112	151	18.19
4-8	39	6	12	109	97	12.2	18-1	26	5	12	82	117	13.77
9-1	31	3	12	12	8	0.85	18-2	27	3	12	94	102	12.93
9-7	33	7	14	241	209	25.17	18-3	17	1	6	31	49	6
9-8	47	9	16	122	110	13.6	19-1	31	4	10	75	69	8.08
9-9	46	8	16	152	115	15.1	19-2	39	5	12	79	94	11.62
9-10	40	7	15	158	105	12.37	19-3	34	4	11	67	64	7.66
11-1	43	8	14	145	97	11.54	19-4	34	5	11	45	63	6.96
11-2	43	7	16	111	91	10.54	19-5	27.5	3	10	58	54	5.55
11-3	42	7	15	58		1.87	19-6	36	5	12	82	75	9.14
11-4	44	9	16	106	57	6.79	19-7	30.5	5	11	68	77	8.63
11-5	43	5	13	239	238	29.97	19-8	30	5	12	68	93	10.71
11-6	40	7	15	100	49	5.81	19-9	30.5	4	10	48	54	6.36
11-7	35	5	13	105	59	6.59	19-10	30	2	10	33	53	5.56
11-8	41	7	14	51	106	13							

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 31 참조(n=20).

### 5) 세대 진전을 통한 우량 콩 형질전환체의 농업형질 분석 (II)

우리는 4차년도(2016년)까지 생산된 농업형질의 데이터를 종합하여 우수하다고 판단되어지는 ATPGs line들을 선별하여 2017년도에 경북 군위에 위치한 LMO 포장에서 4차 농업형질 분석 및 최종 우수라인 선별을 위해 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, wild type인 광안콩과 비슷하거나 상대적으로 우수한 형질을 보이는 종자를 수확하였다.

2017년도에 정부의 LMO 관리 및 보안이 강화되어 경상북도 군위 LMO 포장 사용 전 파종 유전자들의 알려진 반응 검사를 실시하였다.

#### ○ 독성 및 알레르기성 유사성 비교

- Allergen Online Database (University of Nebraska)를 이용하여 ATPG3 유전자 아미노산 서열을 80mer sliding window 검색방법으로 조사한 결과 Anisakis simplex의 Ani s 11-like protein 2 precursor가 35% 이상 상동성을 보이는 것으로 확인되었으나, 연속한 8개 이상

아미노산 잔기와 일치하는 단백질(peptide)은 없었다.

80mer Sliding Window Search Results

Database	AllergenOnline Database v17 (January 18, 2017)
Input Query	>query naepwtrnssllagavdhsveshnhhhaalltkadlgiaarsoadndeddbreg avevnmrnragspsakakani1vctdsnalrnhlelidsqsdvdlahlsrtrnr gvcvlsstgsvanvtrgaapgvsvlqrrfelisltgafipgspgstgltvlyagv qavvsgsvvpllaigavvlaatfsnatyerlpeeeedggsrrihggsdprlgs nldlsgaagvmpnllipnagatshesytwharpy
Length	281
Number of 80 mers	202
Number of Sequences with hits	1

Hit #	Define	Species	Best %ID	# Hits > 35%	E-val	%ID	length	Links	
1	gi 323575365 gid 1727 Ani s 11-like protein 2 prec	Anisakis simplex	37.00%	1	0.0f202	29	33.60%	134	gi 323575365 GO

AllergenOnline Database v17 (January 18, 2017)

- Allergen Online Database (University of Nebraska)를 이용하여 ATPG4 유전자 아미노산 서열을 80mer sliding window 검색방법으로 조사한 결과 Anisakis simplex의 Ani s 11-like protein 2 precursor와, Bos taurus의 collagen alpha-2(I) chain precursor가 35% 이상의 상동성을 나타내었으며, 연속한 8개 이상 아미노산 잔기와 일치하는 단백질(peptide)을 찾아본 결과 'GGGGGSGG'부분에서 일치하는 단백질이 존재하는 것으로 나타났다.

80mer Sliding Window Search Results

Database	AllergenOnline Database v17 (January 18, 2017)
Input Query	>query MANPWITGVNLSSLETTPPGSSQLKIPDLHSMNNAHQSGNNHHHHEVQNNNDOR DNLSDQEPFESGACAPTFPPFPAGSNNKPSFVYTRGPNALSGVMEIASGTQV TELTATFPFPPSGLCSLNGYVAVYLRPSTAVAAHAGSNAVALGDFEILSLTG SFLPSPAPPGTGLTYLAGGGGQVYVGGSVYGLMAAGPMLIAATFSNATYELPLEEE EAHERGGGGGGGVPGLGGGGSLSSGAGGGGQGLPYVNPQNLVSGGGGGGGGM SQLEAYGHAQPSGF
Length	315
Number of 80 mers	236
Number of Sequences with hits	2

Hit #	Define	Species	Best %ID	# Hits > 35%	E-val	%ID	length	Links	
1	gi 323575365 gid 1727 Ani s 11-like protein 2 prec	Anisakis simplex	36.60%	14	0.014	37.30%	110	gi 323575365 GO	
2	gi 27806257 gid 1565 collagen alpha-2(I) chain pre	Bos taurus	35.01%	16	0.236	0.76	26.00%	269	gi 27806257 GO

AllergenOnline Database v17 (January 18, 2017)

- Allergen Online Database (University of Nebraska)를 이용하여 ATPG6 유전자 아미노산 서열을 80mer sliding window 검색방법으로 조사한 결과 35% 이상 상동성을 보이는 단백질(peptide)가 없었으며, 연속한 8개 이상 아미노산 잔기와 일치하는 단백질(peptide)을 찾아본 결과 'HQQQQQQQ', 'QQQQQQQL'부분에서 일치하는 단백질이 존재하는 것으로 나타났다.

80mer Sliding Window Search Results

Database	AllergenOnline Database v17 (January 18, 2017)
Input Query	>query NDQVYRQLPFPFLSFDLHLHFFHQFHQQQQQQNNHGHDIIDQHRIGSLKRPDQADIDPNE HSSAGKDGOSTPGSGESGGGGGDNHITFRFPFPAGSNNKIPSPPIIITRDSANALKSHV MEVANGDVMESYTVFAPFPFGICVLSNGNAVTVTIPROPASVPGGGSSVNLHGFEI LSLSGSLFPFPFPAWASGLTYLAGGGGQVYVGGSVYGLMAAGPVMYMASFGNAVEFL PLEEDRQEGTAKAVANNIDGNATWSSGTTQTGTQQQQQQQLMQDPTFSGILFPNLMN SVQLPAEAYWTPFPF
Length	317
Number of 80 mers	238
Number of Sequences with hits	0

**No Matches of Greater than 35% Identity Found**

AllergenOnline Database v17 (January 18, 2017)

- Allergen Online Database (University of Nebraska)를 이용하여 ATPG7 유전자 아미노산 서열을 80mer sliding window 검색방법으로 조사한 결과 Anisakis simplex의 Ani s 11-like protein 2 precursor가 35% 이상 상동성을 보이는 것으로 확인되었으며, 연속한 8개 이상







는 것으로 확인된다.

80mer Sliding Window Search Results

Database	AllergenOnline Database v17 (January 18, 2017)
Input Query	>query MONIFRQNLHLQQQHFNQNDSEEECESNFRASVGGGAPFSSNEEDDFRSQLELGSAAAGPG DIVGFRFRFRFPFGSKNKAIPPVITRESANTLRAHILEVAGGSDVFCVSTYAFRRFRGI CVLSGGGTNTNVSIRQPAAGGVTLHGFFEILSLSGSFLPPAPPATSLTIYLAGGGG QVVGGSVVGELIAAGPVIVIAASFTNVAYEKLPLEEEQLQMOAEGGSGSGGSGGGGNN NNNFFPDPSSGLFFFLPLNMQNVHQLPVDGWAIGNNINNSASRGGP
Length	285
Number of 80 mers	206
Number of Sequences with hits	0

**No Matches of Greater than 35% Identity Found**

AllergenOnline Database v17 (January 18, 2017)

- Allergen Online Database (University of Nebraska)를 이용하여 MtATPG2 유전자 아미노산 서열을 80mer sliding window 검색방법으로 조사한 결과 35% 이상 상동성을 보이는 단백질(peptide)가 없었으며, 연속한 8개 이상 아미노산 잔기와 일치하는 단백질(peptide)도 없었다.

80mer Sliding Window Search Results

Database	AllergenOnline Database v17 (January 18, 2017)
Input Query	>query MDGFEAMAFSGGPGSYMHRGAGVAGSGSGGFQLPPGFFPLPNTGIACPNARGGGGD TSSMFSLETOSHNSHANFNHGINIGASSGAPSSDPVKKIKRFRPKYGPDGVSLLKLSPTS APAKSTQEDSTTPSEKPRGFRFPFGSRKQALALGDWMTSSAGLAFSPHVIITGVGEDIA AKLLSLSQDFPRALCILSGNGIVTSTVTLRQPASTNIGVTYEGKIFQILSLSGSYLVAEDSG PSNRTGGISVLSLSPDGHVIGGSVAKLIAGSLIQVWVCSFYVGGGSKVKTQIETAANGES SEPHNDKILASPASAPPQNYVSSLTGMFPGSDVKSVAHTGFDLTRG
Length	351
Number of 80 mers	272
Number of Sequences with hits	0

**No Matches of Greater than 35% Identity Found**

AllergenOnline Database v17 (January 18, 2017)

위와 같이 Allergen Online Database에서 기존에 알려진 알러젠 반응 단백질과의 상동성을 확인해본 결과, ATPG3, ATPG4, ATPG6, ATPG7, ATPG10에서 유사성이 확인 되었다. 이에 본 연구실은 하우스를 설치하여 알려진 단백질과 상동성을 보였던 5 유전자를 격리시켜 화분이 매개되는 것을 방지하였다(그림 83). 2017년 6월 22일 우리는 온실 설치 시기가 늦어져 파종 시기를 맞추기 위해 알려진 반응이 확인되지 않은 ATPG8, MtATPG1, MtATPG2 3 유전자는 포장에 바로 직파를 하였으며, 유사 상동성이 확인되었던 ATPG3, ATPG4, ATPG6, ATPG7, ATPG10 5 유전자는 육묘관에 우선 파종하였다가 온실 설치가 완료된 7월 11일에 이식하였다(그림 84). 전년도의 농업형질 조사 결과 파종 시기에 장기간의 가뭄과 수확시기의 습해로 인해 종자에 곰팡이가 생겨 수확량에 큰 데미지를 입었다. 이에 본 연구실은 환경스트레스로 인한 생육저하를 막기 위해 수시로 균위 LMO 포장을 방문 하였으며, 그림 85는 수확 전 9월 28일에 중간 생육상태 점검시 표현형으로 전반적으로 전년도에 비해 상태가 양호한 것을 확인할 수 있었다.

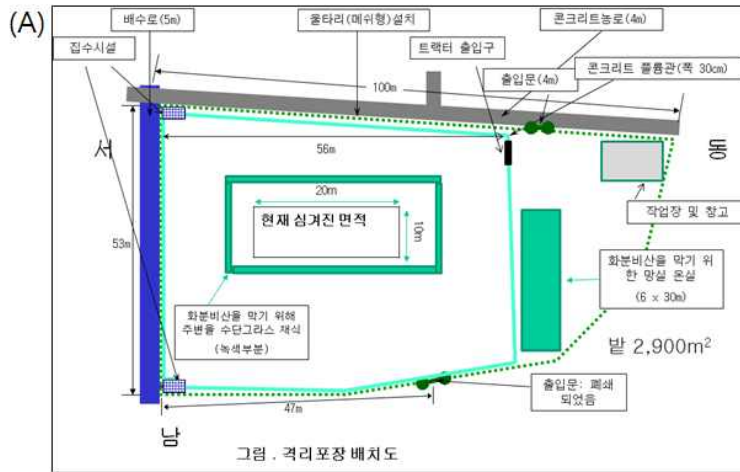


그림 83. 2017년도 군위 LMO 포장 배치도안(A) 및 망실 온실 설치 사진(B).



그림 84. 알러젠 예상 유전자 육묘판 파종(A) 및 포장 직파 사진(B).

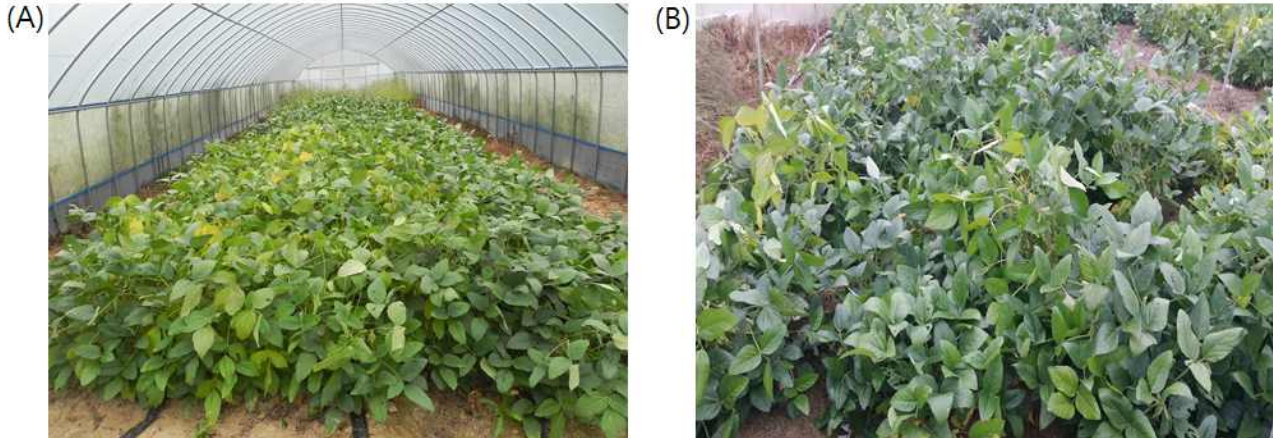


그림 85. 9월 중간 생육확인-망실 온실(A) 및 포장 직파 line 사진(B).

표 43. 농업적 특성 분석(2017년, 군위)에 있어서 광안콩 야생형의 농업적 특성  
2017년도 군위 수확 조사 광안콩(WT)

WT	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
1	56	6	14	107	269	36.19	13.45
2	62	5	11	85	190	24.62	12.96
3	63	5	13	123	297	40.88	13.76
4	63	6	12	103	262	30.25	11.55
5	60	6	14	101	254	34.76	13.69
6	56	6	14	105	282	31.35	11.12
7	56	6	13	107	275	35.91	13.06
8	54	4	11	141	313	35.68	11.40
9	54	5	13	82	198	22.57	11.40
10	58	5	13	94	208	23.71	11.40
11	38	5	13	143	322	50.59	15.71
12	52	3	12	30	69	7.8	11.30
13	54	5	12	122	263	35.27	13.41
14	34	4	10	91	194	28.54	14.71
15	53	4	11	73	174	26.81	15.41
16	53	5	12	119	284	43.48	15.31
17	55	5	12	51	128	23.18	18.11
18	57	5	13	77	187	24.52	13.11
19	40	3	9	88	225	33.1	14.71
20	43	2	11	53	123	16.86	13.71
<b>평균</b>	<b>53.05</b>	<b>4.75</b>	<b>12.15</b>	<b>94.75</b>	<b>225.85</b>	<b>30.30</b>	<b>13.42</b>

3~4차 농업형질 분석에 있어서 광안콩 야생형의 농업형질은 표 43과 같다. 전년도의 광안콩에 비해 경장(cm), 종자 수, 백립중(g), 총중량(g)이 크게 증가한 것을 확인 할 수 있었다(표 31 참고). 이러한 야생종의 생산성 증대 지표 증가는 전년도에 비해 온도, 강수량 등의 안정적인 환경 요인으로 인해 유도된 것으로 판단된다.



표 44. pB2GW7.0-ATPG4 벡터를 이용한 형질전환체의 농업적 특성. p35S-: pB2GW7.0-

2017년도 군위 수확-p35S-ATPG4							
p35S-ATPG4	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
9-2-2-2	42	7	14	167	190	23.05	12.13
9-2-2-2-1	61	6	12	177	388	61.02	15.73
9-2-2-2-2	51	4	10	86	191	30.18	15.80
9-2-2-2-3	71	6	13	137	288	45.73	15.88
9-2-2-2-4	62	7	12	168	395	57.96	14.67
9-2-2-2-5	73	5	12	118	259	40.35	15.58
9-2-2-2-6	80	6	12	121	248	43.9	17.70
9-2-2-2-7	64	6	12	126	278	45.35	16.31
9-2-2-2-8	70	6	13	131	298	46.42	15.58
9-2-2-2-9	72	5	13	100	205	32.59	15.90
9-2-2-2-10	69	6	13	108	273	43.84	16.06
9-2-2-2-11	46	4	9	53	103	16.1	15.63
9-2-2-2-12	54	6	13	135	283	46.98	16.60
9-2-2-2-13	65	5	13	112	234	36.48	15.59
9-2-2-2-14	66	7	12	147	316	49.99	15.82
9-2-2-2-15	60	7	12	126	263	40.59	15.43
9-2-2-2-16	66	8	12	84	158	27.32	17.29
9-2-2-2-17	61	7	13	112	226	34.85	15.42
9-2-2-2-18	67	6	12	117	233	35.79	15.36
9-2-2-2-19	73.5	6	13	142	312	48.28	15.47
9-2-2-2-20	70	4	13	85	167	24.5	14.67
평균	65.08	5.85	12.20	119.25	255.90	40.41	15.79
p35S-ATPG4	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
23-1-2-1	38	6	11	157	307	39	12.70
23-1-2-1-1	68	8	12	163	354	52.67	14.88
23-1-2-1-2	59	6	12	111	236	37.42	15.86
23-1-2-1-3	64	5	13	121	268	40.99	15.29
23-1-2-1-4	41	7	9	125	281	41.29	14.69
23-1-2-1-5	61	6	12	114	244	36.42	14.93
23-1-2-1-6	70	5	13	123	251	37.33	14.87
23-1-2-1-7	60	6	12	109	258	39.34	15.25
23-1-2-1-8	52	5	10	93	185	24.58	13.29
23-1-2-1-9	70.5	6	13	108	243	36.94	15.20
23-1-2-1-10	52	6	10	104	301	31.55	10.48
23-1-2-1-11	60	6	11	86	187	28.65	15.32
23-1-2-1-12	58	6	12	128	283	43.24	15.28
23-1-2-1-13	49	6	9	67	143	20.67	14.45
23-1-2-1-14	63	5	12	93	187	30.96	16.56
23-1-2-1-15	59	7	11	140	287	44.8	15.61
23-1-2-1-16	42	6	9	108	235	35.04	14.91
23-1-2-1-17	61	7	12	102	215	34.06	15.84
23-1-2-1-18	64	6	12	112	234	36.56	15.62
23-1-2-1-19	55	6	13	124	289	46.04	15.93
평균	58.34	6.05	11.42	112.16	246.37	36.77	14.92

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 43 참조(n=20).

3차 농업형질 분석에서 우수했던 #9-2-2-2와 #23-1-2-1 2 line들 중 PPT 선별을 거쳐 살아 남은 개체들을 망실 온실에 이식 하였다. 2 line을 대상으로 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₅ 종자를 수확하였다. pB2GW7.0-ATPG4 벡터를 적용한 콩 형질전환체로부터 4차 농업형질을 조사한 결과, 전체적으로 전년도에 비해 우수한 표현형 및 수확량을 보였으며, 광안콩에 비해서도 경장, 분지수, 마디수, 협수, 백립중 및 총중량이 높게 나타났다(표 44). 개체당 수량이 떨어진 식물체들은 도복이 되었으며 습해에 의한 피해가 발생되었다고 판단되어 진다. 우리는 광안콩으로부터 수량성이 120% 이상인 우수 계통 선별을 목표로 실험을 수행하였다. 그 결과 2 line 모두 120%이상 수량이 증대 되어 우수 계통 후보군으로 선정하였다.

표 45. pCSEN-MtATPG1 벡터를 이용한 형질전환체의 각 라인별 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-

2017년도 균위 수확-pSEN-ATPG6							
pSEN-AT6	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
<b>1-8</b>	<b>35</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	<b>125</b>	<b>177</b>	<b>22.77</b>	12.86
1-8-1	58	8	12	200	314	49.06	15.62
1-8-2	73	5	13	106	221	36.04	16.31
1-8-3	65	5	13	114	206	33.22	16.13
1-8-4	55	6	9	153	231	35.33	15.29
1-8-5	55	5	11	73	142	22.86	16.10
1-8-6	56	4	13	64	134	21.17	15.80
1-8-7	57	8	14	138	280	43.43	15.51
1-8-8	55	5	12	72	86	13.58	15.79
1-8-9	62	6	13	182	251	51.66	20.58
1-8-10	65	5	12	65	82	12.49	15.23
1-8-11	64	4	13	110	183	28.83	15.75
1-8-12	60	7	13	132	323	47.88	14.82
1-8-13	70	6	12	113	179	28.72	16.04
1-8-14	56	6	12	150	378	57.27	15.15
1-8-15	18	4	5	51	112	16.65	14.87
1-8-16	70	6	12	152	262	40.49	15.45
1-8-17	56	6	11	153	260	40.4	15.54
1-8-18	48	6	12	190	335	57.09	17.04
<b>평균</b>	<b>57.94</b>	<b>5.67</b>	<b>11.78</b>	<b>123.22</b>	<b>221.06</b>	<b>35.34</b>	<b>15.99</b>

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 43 참조(n=20).

2016년도에 첫 농업형질을 조사하여 광안콩에 비해 기장이나 분지수, 마디수는 적으나 협수 및 수량성이 우수했던 #1-8 line을 추가로 농업형질 조사하였다. 그 결과 pCSEN-ATPG6 벡터를 적용한 콩 형질전환체로부터 농업형질을 조사한 결과 마디수와 협수는 조금 줄었으나, 종자 수 및 총중량, 백립중은 크게 향상된 것을 확인 할 수 있었다. 광안콩과 비교하여도 마디수, 협수, 종자 수는 줄었으나 종자의 상태가 우수하여 총 중량 및 100립중은 오히려 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 하지만 120%이상의 수량성은 보이지 못해 우수계통으로 선별하지 않았다(표 45).

2차 농업형질 분석에서 우수했던 #1-4-1, #3-4-3 2 line들 중 PPT 선발을 거쳐 살아남은 개체들을 망실 온실에 이식 하였다. 2 line을 대상으로 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₄ 종자를 수확하였다. pB2GW7.0-ATPG7 벡터를 적용한 콩 형질전환체로부터 4차 농업형질을 조사한 결과, 전체적으로 전년도에 비해 우수한 표현형 및 수확량을 보였으며, 광안콩에 비해서도 경장, 분지수, 마디수, 협수, 백립중 및 총중량이 매우 우수하게 나타났다(표 46). 개체당 수량이 떨어진 식물체들은 도복에 의한 피해가 발생되었다고 판단되어 진다. 우리는 광안콩으로부터 수량성이 120% 이상인 우수 계통 선별을 목표로 실험을 수행하였다. 그 결과 2 line 모두 120%이상 약 150% 정도의 수량이 증대 되어 우수계통으로 선정하였다.



표 46. pB2GW7.0-ATPG7 벡터를 이용한 형질전환체의 농업적 특성. p35S-: pB2GW7.0-

2017년도 군위 수확-p35S-ATPG7							
p35S-AT7	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
<b>1-4-1</b>	<b>42</b>	<b>4</b>	<b>13</b>	<b>210</b>	<b>154</b>	<b>19.59</b>	<b>12.72</b>
1-4-1-1	67	6	12	156	321	60.82	18.95
1-4-1-2	50	5	10	127	291	43.79	15.05
1-4-1-3	45.5	7	11	146	261	48	18.39
1-4-1-4	65	6	12	125	295	44.16	14.97
1-4-1-5	61	6	13	120	324	49.35	15.23
1-4-1-6	62	5	11	143	285	48.41	16.99
1-4-1-7	49	4	13	178	377	53.64	14.23
1-4-1-8	71	7	11	156	288	50.28	17.77
1-4-1-9	51	5	8	93	192	29.96	15.60
1-4-1-10	66	5	12	167	397	51.31	12.92
1-4-1-11	52	7	12	149	280	48.32	17.26
1-4-1-12	61	7	13	142	325	49.13	15.12
1-4-1-13	62	6	12	108	223	32.72	14.67
1-4-1-14	53.5	5	11	145	286	42.83	14.98
1-4-1-15	56	7	11	146	297	46.69	15.72
1-4-1-16	67	3	8	77	146	22.55	15.45
<b>평균</b>	<b>58.69</b>	<b>5.69</b>	<b>11.25</b>	<b>136.13</b>	<b>286.44</b>	<b>45.12</b>	<b>15.75</b>
<b>3-4-3</b>	<b>43</b>	<b>7</b>	<b>12</b>	<b>130</b>	<b>174</b>	<b>19.88</b>	<b>11.43</b>
3-4-3-1	83	7	14	133	270	41.68	15.44
3-4-3-2	50	4	13	142	321	47.51	14.80
3-4-3-3	50	4	13	102	254	38.87	15.30
3-4-3-4	74	5	13	126	256	38.11	14.89
3-4-3-5	77	5	14	193	402	63.92	15.90
3-4-3-6	75	5	12	159	332	54.5	16.42
3-4-3-7	55	5	13	127	274	42.61	15.55
3-4-3-8	80	5	15	190	397	61.77	15.56
3-4-3-9	86	6	13	152	355	55.1	15.52
3-4-3-10	80	4	13	139	312	49.39	15.83
3-4-3-11	48	4	10	98	176	27	15.34
3-4-3-12	50	4	11	135	276	40.19	14.56
3-4-3-13	56	6	12	146	338	52.25	15.46
3-4-3-14	51	7	13	91	233	49.76	21.36
3-4-3-15	53	4	10	81	192	29.9	15.57
3-4-3-16	75	7	13	102	233	51.64	22.16
3-4-3-17	70	5	13	160	339	52.86	15.59
<b>평균</b>	<b>65.47</b>	<b>5.12</b>	<b>12.65</b>	<b>133.88</b>	<b>291.76</b>	<b>46.89</b>	<b>16.07</b>

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 43 참조(n=20).

표 47. pCSEN-ATPG7 벡터를 이용한 형질전환체의 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-

2017년도 군위 수확-pSEN-ATPG7							
pSEN-AT7	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
<b>3-6-6-6</b>	<b>39</b>	<b>8</b>	<b>13</b>	<b>189</b>	<b>278</b>	<b>36.12</b>	<b>12.99</b>
3-6-6-6-1	42	6	8	39	96	13.38	13.94
3-6-6-6-2	44	5	11	113	270	40.43	14.97
3-6-6-6-3	57	7	11	126	294	43.85	14.91
3-6-6-6-4	54	5	11	122	288	43.36	15.06
3-6-6-6-5	58	5	11	79	190	28.39	14.94
3-6-6-6-6	69	8	10	131	286	44.38	15.52
3-6-6-6-7	56.5	6	12	103	237	35.64	15.04
3-6-6-6-8	69	6	11	136	308	44.97	14.60
3-6-6-6-9	49	2	7	30	66	10.5	15.91
3-6-6-6-10	53	4	11	81	157	23.64	15.06
3-6-6-6-11	59	5	12	73	143	21.55	15.07
3-6-6-6-12	68	7	11	116	256	38.58	15.07
3-6-6-6-13	57	6	11	109	229	36.78	16.06
3-6-6-6-14	63	6	11	79	170	26.13	15.37
3-6-6-6-15	60	6	12	78	152	23.18	15.25
3-6-6-6-16	58	6	12	143	330	50.22	15.22
3-6-6-6-17	52	6	9	84	195	27.7	14.21
3-6-6-6-18	73	5	13	121	275	40.62	14.77
<b>평균</b>	<b>57.86</b>	<b>5.61</b>	<b>10.78</b>	<b>97.94</b>	<b>219.00</b>	<b>32.96</b>	<b>15.05</b>

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 43 참조(n=20).

3차 농업형질 분석에서 우수했던 pCSEN-ATPG7 벡터를 적용한 콩 형질전환체로부터 4차 농업형질을 조사한 결과이다. 그 중 #3-6-6-6 line들 중 PPT 선발을 거쳐 살아남은 개체들을 망실 온실에 이식 하여 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₅ 종자를 수확하였다. pCSEN-ATPG7 벡터를 적용한 콩 형질전환체로부터 4차 농업형질을 조사한 결과, 경장을 제외한 나머지 표현형이 전년도 대비 낮게 나타났으며, 광안콩에 비해서도 수량성만 조금 우수하게 나타났다(표 47). 우리는 광안 콩으로부터 수량성이 120% 이상인 우수 계통 선별을 목표로 실험을 수행하였으므로, #3-6-6-6 line의 경우는 우수계통이 아니라고 판단하였다.

표 48. pCSEN-ATPG7 벡터를 이용한 형질전환체의 각 라인별 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-.

2017년도 근위 수확-pSEN-ATPG7							
pSEN-AT7	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
<b>6-5-6-3</b>	<b>38</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>160</b>	<b>291</b>	<b>38.68</b>	<b>13.29</b>
6-5-6-3-1	49	8	11	158	350	53.65	15.33
6-5-6-3-2	66	8	14	174	377	58.25	15.45
6-5-6-3-3	69	7	13	163	321	48.78	15.20
6-5-6-3-4	53	6	11	98	211	32.45	15.38
6-5-6-3-5	78	7	12	119	267	41.05	15.37
6-5-6-3-6	49	7	10	115	238	36.04	15.14
6-5-6-3-7	66	6	13	103	192	29.78	15.51
6-5-6-3-8	62	6	12	181	330	62.69	19.00
6-5-6-3-9	48	5	9	71	139	21.08	15.17
6-5-6-3-10	58	5	11	110	260	38.39	14.77
6-5-6-3-11	59	7	11	144	316	48.48	15.34
6-5-6-3-12	55	6	9	66	135	19.13	14.17
6-5-6-3-13	60	6	12	135	269	40.78	15.16
6-5-6-3-14	70	7	13	143	330	50.82	15.40
6-5-6-3-15	80	7	11	108	237	35.58	15.01
6-5-6-3-16	66	6	13	158	358	54.59	15.25
6-5-6-3-17	49	6	11	91	207	31.25	15.10
6-5-6-3-18	54	5	11	54	108	16.6	15.37
6-5-6-3-19	78	7	12	160	335	49.4	14.75
6-5-6-3-20	61	5	12	98	238	36.36	15.28
<b>평균</b>	<b>61.50</b>	<b>6.35</b>	<b>11.55</b>	<b>122.45</b>	<b>260.90</b>	<b>40.26</b>	<b>15.43</b>
<b>6-5-6-10</b>	<b>43.5</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>109</b>	<b>253</b>	<b>30.12</b>	<b>11.91</b>
6-5-6-10-1	49	6	9	122	266	40.36	15.17
6-5-6-10-2	55	6	12	126	281	43.54	15.49
6-5-6-10-3	54	6	12	127	292	42.92	14.70
6-5-6-10-4	54	7	10	135	255	39.98	15.68
6-5-6-10-5	56	5	12	144	374	55.27	14.78
6-5-6-10-6	61.5	5	13	112	272	37.57	13.81
6-5-6-10-7	55	8	10	107	222	34.51	15.55
6-5-6-10-8	58	7	12	108	215	31.21	14.52
6-5-6-10-9	55	4	11	101	257	39.14	15.23
6-5-6-10-10	65	4	12	67	139	19.77	14.22
6-5-6-10-11	61	8	11	108	227	35.37	15.58
6-5-6-10-12	66	5	13	99	257	33.94	13.21
6-5-6-10-13	60	5	11	96	194	27.98	14.42
6-5-6-10-14	51	7	11	104	230	35.67	15.51
6-5-6-10-15	62	6	12	114	212	33.01	15.57
6-5-6-10-16	52	8	11	122	237	36.97	15.60
<b>평균</b>	<b>57.16</b>	<b>6.06</b>	<b>11.38</b>	<b>112.00</b>	<b>245.63</b>	<b>36.70</b>	<b>14.94</b>

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 43 참조(n=20).

위 표 48은 3차 농업형질 분석에서 우수했던 pCSEN-ATPG7 벡터를 적용한 콩 형질전환체 중 #6-5-6-3과 #6-5-6-10 2 line들의 결과이다. PPT 선발을 거쳐 살아남은 개체들을 망실 온

실에 이식 하여 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₅ 종자를 수확하였다. pCSEN-ATPG7 벡터를 적용한 콩 형질전환체로부터 4차 농업형질을 조사한 결과, 전년도에 비해 경장 및 수량성이 크게 증대되었으며, 광안콩과 비교해도 수량성이 120~130% 이상 우수한 것으로 나타나 우수 계통 후보로 선정하였다(표 48).

표 49. pCSEN-ATPG7 벡터를 이용한 형질전환체의 각 라인별 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-

2017년도 군위 수확-pSEN-ATPG7								
pSEN-AT7	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중	
7-7-6-2	30	7	10	218	269	38.65	14.37	
7-7-6-2-1	58	5	12	98	233	36.14	15.51	
7-7-6-2-2	40	4	11	95	197	30.16	15.31	
7-7-6-2-3	58	6	12	116	256	38.09	14.88	
7-7-6-2-4	45	4	11	72	147	23.04	15.67	
7-7-6-2-5	55	4	11	87	184	28.46	15.47	
7-7-6-2-6	52	4	11	109	219	34.9	15.94	
7-7-6-2-7	46	6	11	155	397	54.4	13.70	
7-7-6-2-8	59	5	12	137	307	45.41	14.79	
7-7-6-2-9	30	4	9	188	446	65.6	14.71	
7-7-6-2-10	52	7	11	110	256	39.59	15.46	
7-7-6-2-11	70	5	12	91	188	29.55	15.72	
7-7-6-2-12	61.5	6	12	123	272	38.97	14.33	
7-7-6-2-13	57	5	13	179	403	61.16	15.18	
7-7-6-2-14	55	4	10	67	157	24.86	15.83	
7-7-6-2-15	55	5	10	75	166	26.44	15.93	
7-7-6-2-16	61	6	12	106	252	39.36	15.62	
<b>평균</b>	<b>53.41</b>	<b>5.00</b>	<b>11.25</b>	<b>113.00</b>	<b>255.00</b>	<b>38.51</b>	<b>15.10</b>	
<b>7-7-6-7</b>	<b>36</b>	<b>4</b>	<b>11</b>	<b>187</b>	<b>252</b>	<b>32.55</b>	<b>12.92</b>	
7-7-6-7-1	62	6	12	158	339	53.38	15.75	
7-7-6-7-2	36	4	11	144	312	46.4	14.87	
7-7-6-7-3	43	6	11	119	222	31.83	14.34	
7-7-6-7-4	49	4	11	74	177	26.16	14.78	
7-7-6-7-5	56	6	12	143	286	42.5	14.86	
7-7-6-7-6	46	5	11	105	199	30.95	15.55	
7-7-6-7-7	62	5	12	138	324	49.44	15.26	
7-7-6-7-8	45	6	12	186	355	54	15.21	
7-7-6-7-9	56	4	11	101	225	34.57	15.36	
7-7-6-7-10	55	6	12	155	332	53.66	16.16	
7-7-6-7-11	64	6	15	190	408	62.52	15.32	
7-7-6-7-12	46	6	12	141	273	41.54	15.22	
7-7-6-7-13	61	8	13	171	389	60.26	15.49	
7-7-6-7-14	54	7	11	124	276	43.07	15.61	
7-7-6-7-15	51	4	11	109	234	35.83	15.31	
7-7-6-7-16	49	6	11	104	210	31.76	15.12	
<b>평균</b>	<b>52.19</b>	<b>5.56</b>	<b>11.75</b>	<b>135.13</b>	<b>285.06</b>	<b>43.62</b>	<b>15.30</b>	

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 43 참조(n=20).

표 49의 경우, pCSEN-ATPG7 벡터를 적용한 콩 형질전환체 중 #7-7-6-2, #7-7-6-7 2 line 들의 결과이다. PPT 선발을 거쳐 살아남은 개체들을 망실 온실에 이식 하여 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₅ 종자를 수확하였다. 농업형질을 조사한 결과, #7-7-6-2의 경우 전년도에 비해 표현형 및 수량성이 비슷한 양상을 보였으며, #7-7-6-7의 경우 전년도에 비해 수량성 및 표현형 역시 크게 증대된 것을 확인 할 수 있었다.



또한, 2 line 모두 광안콩에 비해 수량성이 125~140% 이상 상당히 우수한 것으로 나타나 우수 계통 후보로 선정하였다.

표 50. pCSEN-ATPG7 벡터를 이용한 형질전환체의 각 라인별 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-.

2017년도 군위 수확-pSEN-ATPG7							
pSEN-AT7	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
<b>8-3-3-10</b>	<b>42</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>210</b>	<b>246</b>	<b>31.73</b>	<b>12.90</b>
8-3-3-10-1	50	5	12	92	208	31.93	15.35
8-3-3-10-2	50	4	12	90	241	35.64	14.79
8-3-3-10-3	55	4	12	120	266	41.35	15.55
8-3-3-10-4	55	4	12	85	272	40.68	14.96
8-3-3-10-5	50	4	11	123	322	49.72	15.44
8-3-3-10-6	60	5	13	130	232	49.96	21.53
8-3-3-10-7	50	4	13	113	284	44.38	15.63
8-3-3-10-8	55	5	13	116	283	45.37	16.03
8-3-3-10-9	55	5	13	133	302	48.5	16.06
8-3-3-10-10	50	4	10	85	167	24.12	14.44
8-3-3-10-11	50	7	13	120	199	47.27	23.75
8-3-3-10-12	55	5	13	117	378	58.81	15.56
8-3-3-10-13	55	5	13	115	246	39	15.85
8-3-3-10-14	60	6	13	140	327	49.55	15.15
8-3-3-10-15	55	7	12	110	377	57.59	15.28
8-3-3-10-16	35	5	12	40	95	13.38	14.08
8-3-3-10-17	50	4	12	98	212	33.13	15.63
8-3-3-10-18	50	6	12	71	200	31.88	15.94
<b>평균</b>	<b>52.22</b>	<b>4.94</b>	<b>12.28</b>	<b>105.44</b>	<b>256.17</b>	<b>41.24</b>	<b>16.10</b>
<b>8-3-3-12</b>	<b>46</b>	<b>6</b>	<b>13</b>	<b>193</b>	<b>198</b>	<b>26.89</b>	<b>13.58</b>
8-3-3-12-1	70	6	14	171	432	61.24	14.18
8-3-3-12-2	47	8	10	149	328	47.83	14.58
8-3-3-12-3	42	6	10	107	289	44.82	15.51
8-3-3-12-4	53	6	10	71	155	24.22	15.63
8-3-3-12-5	50	7	11	162	376	56.99	15.16
8-3-3-12-6	56	6	9	52	88	13.38	15.20
8-3-3-12-7	42	6	11	80	156	23.37	14.98
8-3-3-12-8	54.5	8	11	151	347	56.02	16.14
8-3-3-12-9	58	5	11	111	262	39.68	15.15
8-3-3-12-10	48	6	9	91	189	27.69	14.65
8-3-3-12-11	54	5	11	157	386	57.94	15.01
8-3-3-12-12	52	6	11	122	241	37.8	15.68
8-3-3-12-13	49	9	11	160	344	50.67	14.73
8-3-3-12-14	43	6	9	87	199	30.6	15.38
8-3-3-12-15	57	8	11	154	368	55.51	15.08
8-3-3-12-16	59.5	5	11	98	232	35.96	15.50
<b>평균</b>	<b>52.19</b>	<b>6.44</b>	<b>10.63</b>	<b>120.19</b>	<b>274.50</b>	<b>41.48</b>	<b>15.11</b>

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 43 참조(n=20).

표 50의 경우, pCSEN-ATPG7 벡터를 적용한 콩 형질전환체 중 #8-3-3-10, #8-3-3-12 2 line들의 결과이다. PPT 선발을 거쳐 살아남은 개체들을 망실 온실에 이식 하여 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₅ 종자를 수확하였다. 농업형질을 조사한 결과, #8-3-3-10과 #8-3-3-12 모두 전년도에 비해 수량성이 크게 증대된 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 2 line 모두 광안콩에 비해 수량성이 130% 이상 상당히 우수한 것으로 나타나 우수 계통 후보로 선정하였다.

표 51. pCSEN-ATPG7 벡터를 이용한 형질전환체의 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-

2017년도 군위 수확-pSEN-ATPG7							
pSEN-AT7	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
<b>23-1</b>	<b>45</b>	<b>6</b>	<b>13</b>	<b>159</b>	<b>203</b>	<b>31.18</b>	15.36
23-1-1	48	5	11	145	391	55.59	14.22
23-1-2	55	6	13	153	338	47.6	14.08
23-1-3	70	7	13	157	374	52.32	13.99
23-1-4	59	5	12	151	312	47.12	15.10
23-1-5	52	5	13	128	308	45.38	14.73
23-1-6	64	5	12	145	331	51.51	15.56
23-1-7	60	4	13	90	207	29.88	14.43
23-1-8	56	6	11	127	280	42.43	15.15
23-1-9	65	6	12	108	374	33.25	8.89
23-1-10	65	5	11	82	172	24.61	14.31
23-1-11	50	5	10	119	254	36.88	14.52
23-1-12	66	7	12	144	315	46.5	14.76
23-1-13	59	6	11	158	334	54.72	16.38
23-1-14	56	6	13	150	369	53.91	14.61
23-1-15	58	6	14	135	298	43.15	14.48
<b>평균</b>	<b>58.87</b>	<b>5.60</b>	<b>12.07</b>	<b>132.80</b>	<b>310.47</b>	<b>44.32</b>	<b>14.28</b>

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 43 참조(n=20).

표 51의 경우, pCSEN-ATPG7 벡터를 적용한 콩 형질전환체 중 세대가 상대적으로 늦은 #23-1의 2차 농업형질을 조사한 것으로, PPT 선발을 거쳐 살아남은 개체들을 망실 온실에 이식 하여 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였다. 농업형질을 조사한 결과, 전년도에 비해 수량성이 크게 증대되었으며, 광안콩에 비해서도 수량성이 140% 이상 상당히 우수한 것으로 나타나 우수 계통으로 선정하였다.

3차 농업형질 분석에서 우수했던 #1-4-1-1, #2-1-1-5 2 line들 중 PPT 선발을 거쳐 살아남은 개체들을 망실 온실에 이식 하였다. 2 line을 대상으로 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, T₅ 종자를 수확하였다. pB2GW7.0-ATPG8 벡터를 적용한 콩 형질전환체로부터 4차 농업형질을 조사한 결과, 전체적으로 전년도에 비해 표현형 및 수확량이 상당히 큰 폭으로 증가 하였으며, 광안콩에 비해서도 경장, 분지수, 마디수, 협수, 백립중 및 총중량이 매우 우수하게 나타났다(표 52). 개체당 수량이 떨어진 식물체들은 도복에 의한 피해가 발생되었다고 판단되어 진다. 우리는 광안 콩으로부터 수량성이 120% 이상인 우수 계통 선별을 목표로 실험을 수행하였다. 그 결과 2 line 모두 150% 이상 수량이 증대 되어 우수계통으로 선정하였다.



표 52. pB2GW7.0-ATPG8 벡터를 이용한 형질전환체의 농업적 특성. p35S-: pB2GW7.0-.

2017년도 군위 수확-p35S-ATPG8							
p35S-AT8	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
<b>1-4-1-1</b>	35.5	5	13	141	125	16.28	13.02
1-4-1-1-1	63	8	14	276	472	88.15	18.68
1-4-1-1-2	63	7	14	109	270	35.24	13.05
1-4-1-1-3	70	4	13	67	158	19.56	12.38
1-4-1-1-4	61	8	15	161	484	67.62	13.97
1-4-1-1-5	70	5	14	177	183	26.44	14.45
1-4-1-1-6	76	7	15	156	353	47.7	13.51
1-4-1-1-7	80	8	16	131	287	42.32	14.75
1-4-1-1-8	70	8	16	269	465	67.78	14.58
1-4-1-1-9	80	7	18	129	286	38.55	13.48
1-4-1-1-10	66	5	15	160	367	53.48	14.57
1-4-1-1-11	51	4	12	49	99	14.38	14.53
1-4-1-1-12	70	8	15	260	506	84.9	16.78
1-4-1-1-13	66	5	15	160	367	53.48	14.57
1-4-1-1-14	63	5	15	152	345	41.93	12.15
1-4-1-1-15	64	6	14	34	59	8.8	14.92
<b>평균</b>	<b>67.53</b>	<b>6.33</b>	<b>14.73</b>	<b>152.67</b>	<b>313.40</b>	<b>46.02</b>	<b>14.68</b>
<b>2-1-1-5</b>	35	5	13	73	101	12.72	12.59
2-1-1-5-1	63	7	15	230	561	89.99	16.04
2-1-1-5-2	67	7	16	210	401	71.75	17.89
2-1-1-5-3	56	3	7	170	318	58.96	18.54
2-1-1-5-4	63	5	14	102	232	33.8	14.57
2-1-1-5-5	70	7	14	165	313	60.51	19.33
2-1-1-5-6	63	7	15	150	388	57.66	14.86
2-1-1-5-7	60	7	14	160	377	52.53	13.93
2-1-1-5-8	68	4	15	70	190	28.54	15.02
2-1-1-5-9	62	8	16	155	372	47.35	12.73
2-1-1-5-10	67	7	15	115	269	42.61	15.84
2-1-1-5-11	66	6	14	115	292	41.05	14.06
2-1-1-5-12	66	7	15	170	417	63.64	15.26
2-1-1-5-13	63	6	15	95	262	37.02	14.13
2-1-1-5-14	68	8	16	220	490	68.48	13.98
2-1-1-5-15	67	6	16	155	406	54.96	13.54
<b>평균</b>	<b>64.60</b>	<b>6.33</b>	<b>14.47</b>	<b>152.13</b>	<b>352.53</b>	<b>53.92</b>	<b>15.30</b>

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 43 참조(n=20).

표 53. pCSEN-ATPG8 벡터를 이용한 형질전환체의 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-.

2017년도 군위 수확-pSEN-ATPG8							
pSEN-AT8	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
<b>3-9-3</b>	30	4	12	123	141	15.98	11.33
3-9-3-1	41	7	15	181	296	52.12	17.61
3-9-3-2	35	4	12	141	285	34.73	12.19
3-9-3-3	55	7	15	214	413	56.58	13.70
3-9-3-4	56	4	14	78	168	22.76	13.55
3-9-3-5	90	5	11	101	79	10.7	13.54
3-9-3-6	45	6	12	74	118	12.3	10.42
3-9-3-7	50	4	11	85	87	10.27	11.80
3-9-3-8	62	7	13	226	390	57.26	14.68
3-9-3-9	45	6	13	40	61	7.32	12.00
3-9-3-10	56	6	14	179	361	44.28	12.27
3-9-3-11	50	7	15	185	495	53.34	10.78
3-9-3-12	70	8	15	179	405	58.61	14.47
<b>평균</b>	<b>54.58</b>	<b>5.92</b>	<b>13.33</b>	<b>140.25</b>	<b>263.17</b>	<b>35.02</b>	<b>13.31</b>
<b>10-3</b>	18	4	8	56	114	11.82	10.37
10-3-1	51	7	15	172	325	58.32	17.94
10-3-2	40.5	6	13	92	223	27.9	12.51
10-3-3	47	8	16	192	402	57.16	14.22
10-3-4	41.5	5	13	109	257	35.56	13.84
10-3-5	50	6	12	124	244	32.1	13.16
10-3-6	44	6	13	130	211	39.5	18.72
10-3-7	45	7	14	224	555	77.23	13.92
10-3-8	33	4	10	48	100	14.55	14.55
<b>평균</b>	<b>44.00</b>	<b>6.13</b>	<b>13.25</b>	<b>136.38</b>	<b>289.63</b>	<b>42.79</b>	<b>14.77</b>

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 43 참조(n=20).

표 53의 경우, pCSEN-ATPG8 벡터를 적용한 콩 형질전환체 중 #3-9-3, #10-3 2 line들의 결과이다. PPT 선별을 거쳐 살아남은 개체들을 망실 온실에 이식 하여 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, 종자를 수확하였다. 농업형질을 조사한 결과, 두 라인 모두 전 년도에 비해 표현형 및 수량성이 크게 증가하였으며, 2 line 모두 광안콩에 비해서도 높은 수량성을 나타내었다. 개체당 수량이 떨어진 식물체들은 도복에 의한 피해가 발생되었다고 판단되어 지며, #10-3 line의 경우 수량성이 140% 이상 상당히 우수하여 후보 계통으로 선정하였다.

표 54. pCSEN-ATPG10 벡터를 이용한 형질전환체의 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-

2017년도 군위 수확-pSEN-ATPG10							
pSEN-AT10	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
<b>8-3</b>	<b>43</b>	<b>4</b>	<b>13</b>	<b>157</b>	<b>187</b>	<b>25.73</b>	<b>13.76</b>
8-3-1	45	4	11	90	228	38.66	16.96
8-3-2	85	5	12	140	367	62.6	17.06
8-3-3	55	5	10	84	258	38.88	15.07
8-3-4	60	5	11	105	276	44.56	16.14
8-3-5	55	4	10	70	175	30.02	17.15
8-3-6	110	4	12	50	142	23.73	16.71
8-3-7	105	5	15	110	274	49.37	18.02
8-3-8	110	5	13	110	330	58.88	17.84
8-3-9	80	6	13	135	235	59.68	25.40
8-3-10	90	5	15	80	173	28.58	16.52
8-3-11	95	6	13	85	175	45.34	25.91
8-3-12	102	3	12	56	124	19.4	15.65
8-3-13	60	7	11	135	377	58.7	15.57
8-3-14	75	7	14	105	295	59.6	20.20
8-3-15	100	5	12	110	209	37	17.70
8-3-16	110	4	13	85	181	27.64	15.27
8-3-17	110	6	14	110	197	33.17	16.84
8-3-18	105	4	15	135	377	61.14	16.22
8-3-19	55	5	11	100	207	35.1	16.96
<b>평균</b>	<b>84.58</b>	<b>5.00</b>	<b>12.47</b>	<b>99.74</b>	<b>242.11</b>	<b>42.74</b>	<b>17.65</b>
<b>9-1</b>	<b>46</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>125</b>	<b>188</b>	<b>25.78</b>	<b>13.71</b>
9-1-1	65	7	13	142	301	52.56	17.46
9-1-2	50	7	13	173	386	59.74	15.48
9-1-3	45	4	12	95	183	31.22	17.06
9-1-4	83	7	12	101	231	43.1	18.66
9-1-5	89	9	16	137	308	55.45	18.00
9-1-6	120	7	16	105	250	40.64	16.26
9-1-7	91	8	16	56	139	20.12	14.47
9-1-8	78	5	14	77	159	27.63	17.38
9-1-9	84	7	15	173	365	62.5	17.12
9-1-10	82	7	14	111	217	33.64	15.50
9-1-11	78	10	16	158	366	64.27	17.56
9-1-12	76	7	13	158	333	77.56	23.29
9-1-13	91	10	15	146	286	48.62	17.00
9-1-14	48	7	16	96	238	36.71	15.42
9-1-15	48	7	13	128	286	43.51	15.21
9-1-16	79	8	16	162	369	59.26	16.06
9-1-17	89	7	13	81	163	25.78	15.82
9-1-18	61	8	13	159	363	54.9	15.12
9-1-19	52	7	11	67	167	27.51	16.47
<b>평균</b>	<b>74.16</b>	<b>7.32</b>	<b>14.05</b>	<b>122.37</b>	<b>268.95</b>	<b>45.51</b>	<b>16.92</b>

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 43 참조(n=20).

표 54의 경우, pCSEN-ATPG8 벡터를 적용한 콩 형질전환체 중 1차 농업형질 분석에서 우수하다고 판단되어진 #8-3과 #9-1 2 line들의 결과이다. PPT 선발을 거쳐 살아남은 개체들을 망실 온실에 이식 하여 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, 종자를 수확하였다. 농업형질을 조사한 결과, 두 라인 모두 전 년도에 비해 표현형 및 수량성이 크게 증가하였으며, 2 line 모두 광안콩에 비해서도 높은 수량성을 나타내었다. 개체당 수량이 떨어진 식물체들은 도복에 의한 피해가 발생하였다고 판단되어 지며, 두 라인 모두 광안콩에 비해 수량성이 140% 이상 상당히 우수하여 우수계통으로 선정하였다.

표 55. p35S-MtATPG1 벡터를 이용한 형질전환체의 농업적 특성 분석. p35S-: pB2GW7.0-

2017년도 군위 수확-p35S-MtATPG1							
p35S-Mt1	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
<b>12-1</b>	<b>39</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>218</b>	<b>190</b>	<b>25.89</b>	<b>13.63</b>
12-1-1	68	7	14	102	309	40.83	13.21
12-1-2	61	8	16	160	273	55.35	20.27
12-1-3	49	8	12	159	444	60.32	13.59
12-1-4	57	6	12	118	251	32.48	12.94
12-1-5	50	6	13	113	284	35	12.32
12-1-6	53	5	12	90	244	29.33	12.02
12-1-7	58	7	13	75	229	31.32	13.68
12-1-8	59	6	11	100	219	27.52	12.57
12-1-9	56	4	12	45	128	15.37	12.01
12-1-10	54	5	11	113	270	38.44	14.24
<b>평균</b>	<b>56.5</b>	<b>6.2</b>	<b>12.6</b>	<b>107.5</b>	<b>265.1</b>	<b>36.596</b>	<b>13.80</b>
<b>12-3</b>	<b>35</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>160</b>	<b>188</b>	<b>23.55</b>	<b>12.53</b>
12-3-1	59	5	14	69	174	24.24	13.93
12-3-2	56	6	12	136	323	42.98	13.31
12-3-3	54	4	12	56	90	12.9	14.33
12-3-4	50	6	10	215	486	81.55	16.78
12-3-5	55	5	9	136	336	50.08	14.90
12-3-6	51	6	12	142	333	42.35	12.72
12-3-7	59	6	15	125	321	42.55	13.26
12-3-8	55	6	13	52	116	15.95	13.75
12-3-9	59	6	12	71	128	18.17	14.20
12-3-10	68	7	14	82	207	27.64	13.35
12-3-11	56	6	13	42	104	13.5	12.98
12-3-12	60	6	14	97	246	30.08	12.23
12-3-13	48	6	13	132	308	40.29	13.08
12-3-14	38	5	10	191	483	68.45	14.17
12-3-15	54	7	10	55	135	18.45	13.67
12-3-16	63	6	11	100	242	32.46	13.41
12-3-17	64	6	13	102	324	33.18	10.24
<b>평균</b>	<b>55.82</b>	<b>5.82</b>	<b>12.18</b>	<b>106.06</b>	<b>256.24</b>	<b>34.99</b>	<b>13.66</b>

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 43 참조(n=20).

표 55의 경우, pB2GW7.0-MtATPG1 벡터를 적용한 콩 형질전환체 중 1차 농업형질 분석에서 우수하다고 판단되어진 #12-1과 #12-3 2 line들의 결과이다. PPT 선발을 거쳐 살아남은 개체들을 망실 온실에 이식 하여 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을



조사하였으며, 종자를 수확하였다. 농업형질을 조사한 결과, 두 라인 모두 전 년도에 비해 표현형 및 수량성이 증가하였으며, 광안콩에 비해서도 상대적으로 높은 수량성을 나타내었다. 개체당 수량이 떨어진 식물체들은 도복에 의한 피해가 발생되었다고 판단되어 지며, 광안 콩보다 수량성이 120% 이상인 우수 계통 선별을 목표로 실험을 수행하였으나, 2 line 모두 120%는 넘지 못해 우수계통 후보에서 제외하였다.

표 56. p35S-MtATPG2 벡터를 이용한 형질전환체의 농업적 특성 분석. p35S-: pB2GW7.0-.

2017년도 군위 수확-p35S-MtATPG2							
p35S-Mt2	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
<b>9-7</b>	<b>33</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>241</b>	<b>209</b>	<b>25.17</b>	12.04
9-7-1	59	5	14	70	182	22.7	12.47
9-7-2	67	5	14	73	202	27.32	13.52
9-7-3	67	7	15	102	283	36.95	13.06
9-7-4	55	6	13	196	411	61.02	14.85
9-7-5	69	7	15	98	252	32.83	13.03
9-7-6	62	6	13	60	144	19.19	13.33
9-7-7	73	5	14	98	279	37.14	13.31
9-7-8	53	4	13	52	126	16.47	13.07
9-7-9	61	5	13	82	205	25.24	12.31
9-7-10	57	6	13	110	266	36.73	13.81
9-7-11	60	5	15	110	281	37.27	13.26
<b>평균</b>	<b>62.09</b>	<b>5.55</b>	<b>13.82</b>	<b>95.55</b>	<b>239.18</b>	<b>32.08</b>	<b>13.41</b>
<b>11-5</b>	<b>43</b>	<b>5</b>	<b>13</b>	<b>239</b>	<b>238</b>	<b>29.97</b>	12.59
11-5-1	49	5	12	80	176	25.54	14.51
11-5-2	53	5	13	79	200	29.69	14.85
11-5-3	51	5	10	77	182	25.57	14.05
11-5-4	38	5	9	80	216	31.05	14.38
11-5-5	52	6	13	97	267	38.78	14.52
11-5-6	49	4	13	32	98	13.06	13.33
11-5-7	46	6	12	99	221	32.72	14.81
11-5-8	55	6	13	118	268	34.7	12.95
11-5-9	63	7	15	149	372	51.37	13.81
11-5-10	54	6	13	106	198	43.48	21.96
11-5-11	50	6	14	166	397	59.09	14.88
11-5-12	47	5	12	71	207	27.78	13.42
11-5-13	52	6	11	135	339	43.78	12.91
11-5-14	49	5	11	82	180	24.8	13.78
11-5-15	58	4	14	94	241	34.25	14.21
<b>평균</b>	<b>51.07</b>	<b>5.40</b>	<b>12.33</b>	<b>97.67</b>	<b>237.47</b>	<b>34.38</b>	<b>14.48</b>

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 43 참조(n=20).

표 56의 경우, pB2GW7.0-MtATPG2 벡터를 적용한 콩 형질전환체 중 1차 농업형질 분석에서 우수하다고 판단되어진 #9-7, #11-5 2 line들의 결과이다. PPT 선발을 거쳐 살아남은 개체들을 망실 온실에 이식 하여 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 백립중(g), 총중량(g)을 조사하였으며, 종자를 수확하였다. 농업형질을 조사한 결과, 두 라인 모두 전 년도에 비해 표현형 및 수량성이 비슷하거나 증가하였으며, 광안콩에 비해서도 상대적으로 높은 수량성을 나타내었다. 하지만 광안콩 대비 120% 이상인 우수 계통 선별을 목표로 실험을 수행하였으나, 2 line 모두 120%는 넘지 못해 우수계통 후보에서 제외하였다.

**SUMMARY:**

- 본 연구의 목적은 120% 이상의 종자수확량을 가지는 콩 형질전환체 개발에 있다. 2016년까

지 기능 분석을 통하여 2017년도에 파종한 라인인은 총 23 라인이며, 이들에 대한 3~4차 농업형질 분석결과 대부분의 라인들이 100% 이상의 종자수확량을 가지고 있었으며, 특히 17 라인은 120% 이상의 종자 수확량을 가지고 있었다(그림 86).

- 이러한 사실로 보아 본 연구에 도입한 유용 유전자, 즉 *ATPGs* 유전자들은 식물체의 수량성을 증대시키고 농업형질을 개선하는데 매우 효과적일 것으로 판단된다.
- 흥미로운 점은 특히 최소화 벡터인 pCSEN 벡터를 적용한 형질전환 라인에서도 종자 수확량 증가와 같은 농업형질이 발현된다는 것이다. 이러한 사실은 본 연구에서 사용한 pCSEN 벡터의 사용은 농업형질 개선이라는 고유의 목적에 맞을 뿐 만 아니라 특히 최소화의 목적에도 적합하는 것이다. 따라서 pSEN 벡터는 우량 작물 개발에 적합한 벡터 시스템 중 하나인 것으로 사료된다.
- 우리는 상기의 형질전환 라인 중 135% 이상의 종자 수확량을 가지는 우수 형질전환 라인을 우수계통으로 선별하였으며, 이를 계속 육성해 나가고자 한다.

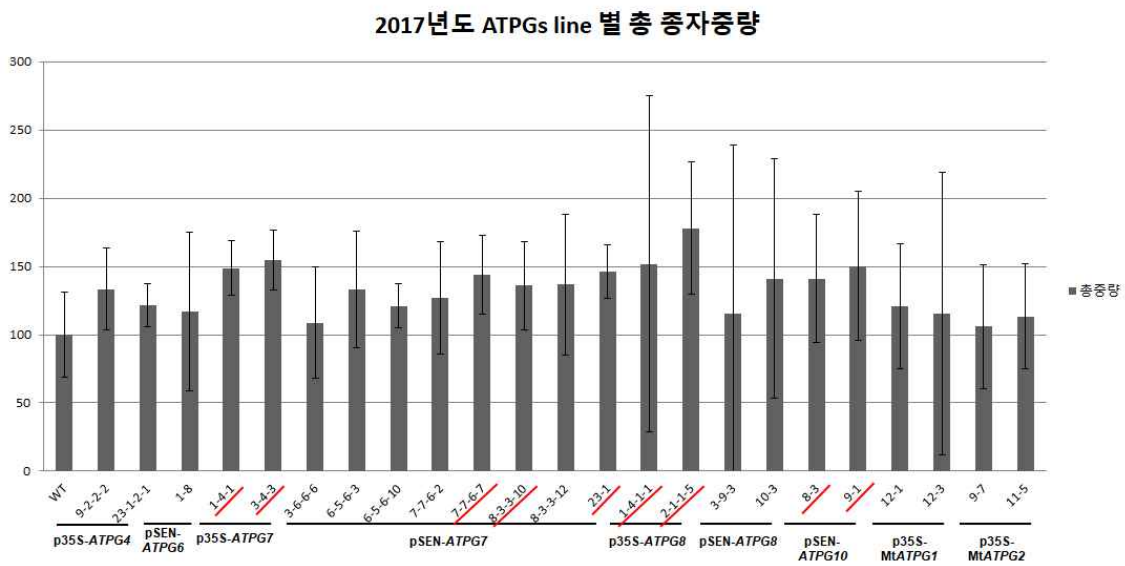


그림 86. 2017년 파종 ATPGs 라인들의 종자 총증량. pSEN-: pCSEN-, p35S-: pB2GW7.0-

## 6) 우량 콩 형질전환 라인으로부터 우수계통 선별 및 육성

우리는 wild type인 광안콩 대비 수확량이 120% 이상 증대된 형질전환체를 생산하기 위해 2013년도부터 형질전환체 생산을 실시하였으며, 2014년도부터 세대 진전을 거쳐 농업형질을 조사하였다. 현재 4차례의 농업형질을 조사하였으며, 최종 4차 농업형질의 결과를 바탕으로 우수계통을 선별하였다. 이 때, 환경 스트레스 및 도복에 의해 모집단을 구성하는 개체들 간의 이질성이 크게 나타나, 통계치의 신뢰도를 높이기 위해 관측치의 최대값 2개체, 최소값 2개체를 제외하여 평균값을 계상하였다. 종자의 총 중량(g)을 기준으로 선별하였으며, 광안콩에 비해 120%이상의 수량성을 목표로 하였으나 예상보다 더욱 좋은 결과를 나타내어 135%이상의 수확성을 보이는 9 line을 최종 선별하였다.



표 57. 농업적 특성 분석(2017년, 군위)에 있어서 광안콩 야생형의 농업적 특성

2017년도 군위 수확 조사-광안콩(WT)							
WT	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
1	56	6	14	107	269	36.19	13.45
2	62	5	11	85	190	24.62	12.96
3	63	5	13	123	297	40.88	13.76
4	63	6	12	103	262	30.25	11.55
5	60	6	14	101	254	34.76	13.69
6	56	6	14	105	282	31.35	11.12
7	56	6	13	107	275	35.91	13.06
8	54	4	11	141	313	35.68	11.40
9	54	5	13	82	198	22.57	11.40
10	58	5	13	94	208	23.71	11.40
13	54	5	12	122	263	35.27	13.41
14	34	4	10	91	194	28.54	14.71
15	53	4	11	73	174	26.81	15.41
17	55	5	12	51	128	23.18	18.11
18	57	5	13	77	187	24.52	13.11
19	40	3	9	88	225	33.1	14.71
평균	54.69	5.00	12.19	96.88	232.44	30.46	13.10

표 57의 경우, 대조군인 광안콩의 최대치와 최소치를 제외하여 평균을 나타내었다. 그 결과 표 43의 기존 데이터보다 조금씩 증가하는 경향을 보였으나 큰 차이를 보이지 않았다.

표 58. pCSEN-ATPG7 벡터를 이용한 형질전환체의 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-

2017년도 군위 수확-pCSEN-ATPG7							
pSEN-AT7	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
7-7-6-7	36	4	11	187	252	32.55	12.92
7-7-6-7-1	62	6	12	158	339	53.38	15.75
7-7-6-7-2	36	4	11	144	312	46.4	14.87
7-7-6-7-3	43	6	11	119	222	31.83	14.34
7-7-6-7-5	56	6	12	143	286	42.5	14.86
7-7-6-7-7	62	5	12	138	324	49.44	15.26
7-7-6-7-8	45	6	12	186	355	54	15.21
7-7-6-7-9	56	4	11	101	225	34.57	15.36
7-7-6-7-10	55	6	12	155	332	53.66	16.16
7-7-6-7-12	46	6	12	141	273	41.54	15.22
7-7-6-7-14	54	7	11	124	276	43.07	15.61
7-7-6-7-15	51	4	11	109	234	35.83	15.31
7-7-6-7-16	49	6	11	104	210	31.76	15.12
평균	51.25	5.50	11.50	135.17	282.33	43.17	15.29
8-3-3-10	42	7	13	210	246	31.73	12.90
8-3-3-10-1	50	5	12	92	208	31.93	15.35
8-3-3-10-2	50	4	12	90	241	35.64	14.79
8-3-3-10-3	55	4	12	120	266	41.35	15.55
8-3-3-10-4	55	4	12	85	272	40.68	14.96
8-3-3-10-5	50	4	11	123	322	49.72	15.44
8-3-3-10-6	60	5	13	130	232	49.96	21.53
8-3-3-10-7	50	4	13	113	284	44.38	15.63
8-3-3-10-8	55	5	13	116	283	45.37	16.03
8-3-3-10-9	55	5	13	133	302	48.5	16.06
8-3-3-10-11	50	7	13	120	199	47.27	23.75
8-3-3-10-13	55	5	13	115	246	39	15.85
8-3-3-10-14	60	6	13	140	327	49.55	15.15
8-3-3-10-17	50	4	12	98	212	33.13	15.63
8-3-3-10-18	50	6	12	71	200	31.88	15.94
평균	53.21	4.86	12.43	110.43	256.71	42.03	16.37
23-1	45	6	13	159	203	31.18	15.36
23-1-2	55	6	13	153	338	47.6	14.08
23-1-3	70	7	13	157	374	52.32	13.99
23-1-4	59	5	12	151	312	47.12	15.10
23-1-5	52	5	13	128	308	45.38	14.73
23-1-6	64	5	12	145	331	51.51	15.56
23-1-8	56	6	11	127	280	42.43	15.15
23-1-9	65	6	12	108	374	33.25	8.89
23-1-11	50	5	10	119	254	36.88	14.52
23-1-12	66	7	12	144	315	46.5	14.76
23-1-14	56	6	13	150	369	53.91	14.61
23-1-15	58	6	14	135	298	43.15	14.48
평균	59.18	5.82	12.27	137.91	323.00	45.46	14.07

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 57 참조(n=16).

pCSEN-ATPG7 벡터를 적용한 콩 형질전환체 #7-7-6-7, #8-3-3-10, #23-1 3 line을 최종 우수 계통으로 선별하였다. 3 line 중 총중량이 가장 낮은 8-3-3-10의 경우 광안콩에 비해 수확량이 약 138% 이상 증가하였으며, 가장 높은 수확량을 보인 #23-1 line의 경우 약 150%로 상당히 높은 수량성을 보인 것으로 나타나 최종 우수계통으로 선별하였다(표 58).

표 59. p35S-ATPG7 벡터를 이용한 형질전환체의 농업적 특성 분석. p35S-: pB2GW7.0-.

2017년도 군위 수확 p35S-ATPG7							
p35S-AT7	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
<b>1-4-1</b>	<b>42</b>	<b>4</b>	<b>13</b>	<b>210</b>	<b>154</b>	<b>19.59</b>	<b>12.72</b>
1-4-1-2	50	5	10	127	291	43.79	15.05
1-4-1-3	45.5	7	11	146	261	48	18.39
1-4-1-4	65	6	12	125	295	44.16	14.97
1-4-1-5	61	6	13	120	324	49.35	15.23
1-4-1-6	62	5	11	143	285	48.41	16.99
1-4-1-8	71	7	11	156	283	50.28	17.77
1-4-1-10	66	5	12	167	397	51.31	12.92
1-4-1-11	52	7	12	149	280	48.32	17.26
1-4-1-12	61	7	13	142	325	49.13	15.12
1-4-1-13	62	6	12	108	223	32.72	14.67
1-4-1-14	53.5	5	11	145	286	42.83	14.98
1-4-1-15	56	7	11	146	297	46.69	15.72
<b>평균</b>	<b>58.75</b>	<b>6.08</b>	<b>11.58</b>	<b>139.50</b>	<b>295.58</b>	<b>46.25</b>	<b>15.65</b>
<b>3-4-3</b>	<b>43</b>	<b>7</b>	<b>12</b>	<b>130</b>	<b>174</b>	<b>19.88</b>	<b>11.43</b>
3-4-3-1	83	7	14	133	270	41.68	15.44
3-4-3-2	50	4	13	142	321	47.51	14.80
3-4-3-3	50	4	13	102	254	38.87	15.30
3-4-3-4	74	5	13	126	256	38.11	14.89
3-4-3-6	75	5	12	159	332	54.5	16.42
3-4-3-7	55	5	13	127	274	42.61	15.55
3-4-3-9	86	6	13	152	355	55.1	15.52
3-4-3-10	80	4	13	139	312	49.39	15.83
3-4-3-12	50	4	11	135	276	40.19	14.56
3-4-3-13	56	6	12	146	338	52.25	15.46
3-4-3-14	51	7	13	91	233	49.76	21.36
3-4-3-16	75	7	13	102	233	51.64	22.16
3-4-3-17	70	5	13	160	339	52.86	15.59
<b>평균</b>	<b>65.77</b>	<b>5.31</b>	<b>12.77</b>	<b>131.85</b>	<b>291.77</b>	<b>47.27</b>	<b>16.20</b>

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 57 참조(n=16).

표 60. p35S-ATPG8 벡터를 이용한 형질전환체의 농업적 특성 분석. p35S-: pB2GW7.0-.

2017년도 군위 수확 p35S-ATPG8							
p35S-AT8	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
<b>1-4-1-1</b>	<b>35.5</b>	<b>5</b>	<b>13</b>	<b>141</b>	<b>125</b>	<b>16.28</b>	<b>13.02</b>
1-4-1-1-2	63	7	14	109	270	35.24	13.05
1-4-1-1-3	70	4	13	67	158	19.56	12.38
1-4-1-1-4	61	8	15	161	484	67.62	13.97
1-4-1-1-5	70	5	14	177	183	26.44	14.45
1-4-1-1-6	76	7	15	156	353	47.7	13.51
1-4-1-1-7	80	8	16	131	287	42.32	14.75
1-4-1-1-8	70	8	16	269	465	67.78	14.58
1-4-1-1-9	80	7	18	129	286	38.55	13.48
1-4-1-1-10	66	5	15	160	367	53.48	14.57
1-4-1-1-13	66	5	15	160	367	53.48	14.57
1-4-1-1-14	63	5	15	152	345	41.93	12.15
<b>평균</b>	<b>69.55</b>	<b>6.27</b>	<b>15.09</b>	<b>151.91</b>	<b>324.09</b>	<b>44.92</b>	<b>13.86</b>
<b>2-1-1-5</b>	<b>35</b>	<b>5</b>	<b>13</b>	<b>73</b>	<b>101</b>	<b>12.72</b>	<b>12.59</b>
2-1-1-5-3	56	3	7	170	318	58.96	18.54
2-1-1-5-5	70	7	14	165	313	60.51	19.33
2-1-1-5-6	63	7	15	150	388	57.66	14.86
2-1-1-5-7	60	7	14	160	377	52.53	13.93
2-1-1-5-9	62	8	16	155	372	47.35	12.73
2-1-1-5-10	67	7	15	115	269	42.61	15.84
2-1-1-5-11	66	6	14	115	292	41.05	14.06
2-1-1-5-12	66	7	15	170	417	63.64	15.26
2-1-1-5-13	63	6	15	95	262	37.02	14.13
2-1-1-5-14	68	8	16	220	490	68.48	13.98
2-1-1-5-15	67	6	16	155	406	54.96	13.54
<b>평균</b>	<b>64.36</b>	<b>6.55</b>	<b>14.27</b>	<b>151.82</b>	<b>354.91</b>	<b>53.16</b>	<b>14.98</b>

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 57 참조(n=16).

pB2GW7.0-ATPG7 벡터를 적용한 콩 형질전환체의 경우 3차 농업형질까지 조사가 되었으며, 2 line 모두 높은 수량성과 표현형을 나타내었다(표 59). 2 line은 앞서 제시한 표 46에 비해 최대값과 최소값을 뺀 평균의 총중량이 증가되는 것을 확인 할 수 있었으며, 두 라인 모두 광안콩에 비해 150% 이상 높은 수량성을 보여 최종 우수계통으로 선별하였다.

pB2GW7.0-ATPG8 벡터를 적용한 콩 형질전환체의 경우 총 4차례의 농업형질을 조사하였으며, 2 line 모두 높은 수량성과 표현형을 나타내었다(표 60). 2 line은 앞서 제시한 표 52에 비해 최대값과 최소값을 뺀 평균에서 종자의 수는 증가하였으나 총중량은 조금 감소하는 것으로 나타났으나, #1-4-1-1의 경우 광안콩에 비해 147% 이상 높은 수량성을 보였으며, #2-1-1-5 line의 경우 175%로 상당히 우수한 수량성을 보여 두 라인 모두 최종 우수계통으로 선별하였다.

표 61. pCSEN-ATPG10 벡터를 이용한 형질전환체의 농업적 특성 분석. pSEN-: pCSEN-

2017년도 군위 수확-pSEN-ATPG10							
pSEN-AT10	경장(cm)	분지수(개)	마디수(개)	협수(개)	종자수(개)	총중량(g)	100립중
<b>8-3</b>	<b>43</b>	<b>4</b>	<b>13</b>	<b>157</b>	<b>187</b>	<b>25.73</b>	<b>13.76</b>
8-3-1	45	4	11	90	228	38.66	16.96
8-3-3	55	5	10	84	258	38.88	15.07
8-3-4	60	5	11	105	276	44.56	16.14
8-3-5	55	4	10	70	175	30.02	17.15
8-3-7	105	5	15	110	274	49.37	18.02
8-3-8	110	5	13	110	330	58.88	17.84
8-3-9	80	6	13	135	235	59.68	25.40
8-3-10	90	5	15	80	173	28.58	16.52
8-3-11	95	6	13	85	175	45.34	25.91
8-3-13	60	7	11	135	377	58.7	15.57
8-3-14	75	7	14	105	295	59.6	20.20
8-3-15	100	5	12	110	209	37	17.70
8-3-16	110	4	13	85	181	27.64	15.27
8-3-17	110	6	14	110	197	33.17	16.84
8-3-19	55	5	11	100	207	35.1	16.96
<b>평균</b>	<b>80.33</b>	<b>5.27</b>	<b>12.40</b>	<b>100.93</b>	<b>239.33</b>	<b>43.01</b>	<b>17.97</b>
<b>9-1</b>	<b>46</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>125</b>	<b>188</b>	<b>25.78</b>	<b>13.71</b>
9-1-1	65	7	13	142	301	52.56	17.46
9-1-2	50	7	13	173	386	59.74	15.48
9-1-3	45	4	12	95	183	31.22	17.06
9-1-4	83	7	12	101	231	43.1	18.66
9-1-5	89	9	16	137	308	55.45	18.00
9-1-6	120	7	16	105	250	40.64	16.26
9-1-8	78	5	14	77	159	27.63	17.38
9-1-9	84	7	15	173	365	62.5	17.12
9-1-10	82	7	14	111	217	33.64	15.50
9-1-13	91	10	15	146	286	48.62	17.00
9-1-14	48	7	16	96	238	36.71	15.42
9-1-15	48	7	13	128	286	43.51	15.21
9-1-16	79	8	16	162	369	59.26	16.06
9-1-18	61	8	13	159	363	54.9	15.12
9-1-19	52	7	11	67	167	27.51	16.47
<b>평균</b>	<b>71.67</b>	<b>7.13</b>	<b>13.93</b>	<b>124.80</b>	<b>273.93</b>	<b>45.13</b>	<b>16.48</b>

광안콩 대조구에 대한 농업형질 분석 자료는 표 57 참조(n=16).



pCSEN-ATPG10 벡터를 적용한 콩 형질전환체의 경우 16년도에 첫 과종을 실시하여 총 2차례의 농업형질을 조사하였으며, 2 line 모두 높은 수량성과 표현형을 나타내었다(표 61). 앞서 제시한 표 54와 비교하였을 경우 최대값과 최소값을 뺀 평균에서 #8-3 line은 경장이나 종자수는 감소하였으나 총중량은 및 백립중은 증가하였으며, #9-1의 경우 종자수는 증가하였으나 총중량 및 그 외 경장 등은 감소하였다. 하지만 두 라인 모두 광안콩에 비해 수량성이 120%를 넘어 140~148% 향상된 값을 나타내어 최종 우수 계통으로 선정하였다.

**SUMMARY:**

- 우리는 개발된 형질전환 라인 중 135% 이상의 종자 수확량을 가지는 우수 형질전환 라인을 우수계통으로 선별하였으며, 이들에 대한 생산성 증대 지표 분석은 그림 87과 같다. 그림 87은 wild type인 광안콩을 100% 기준으로 하여, 우수계통으로 선별된 9 line들의 경장(cm), 분지수, 마디수, 개체당 협수, 총중량(g)을 도식화한 것이다.
- 그림 87에서 나타내듯이 경장, 분지수, 마디수 등은 광안콩과 비교하여 line별로 다양한 패턴을 보였으나 협수 및 총 종자량의 경우 전체적으로 135%이상 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- ATPGs 유전자는 콩의 농업형질 개선을 통하여 작물의 생육 및 수량성 개선에 긍정적인 영향을 미쳐 최종 목표인 다수성 콩 형질전환체를 가능하게 하였다. 따라서 ATPGs 유전자의 생산성 증대 농업형질을 요구하는 타 작물 적용 또한 가능하리라 판단된다. 본 연구팀은 선별된 우수계통에 대한 지속적인 육성 및 GM 작물 실용화 연구를 계속적으로 수행하고자 한다.

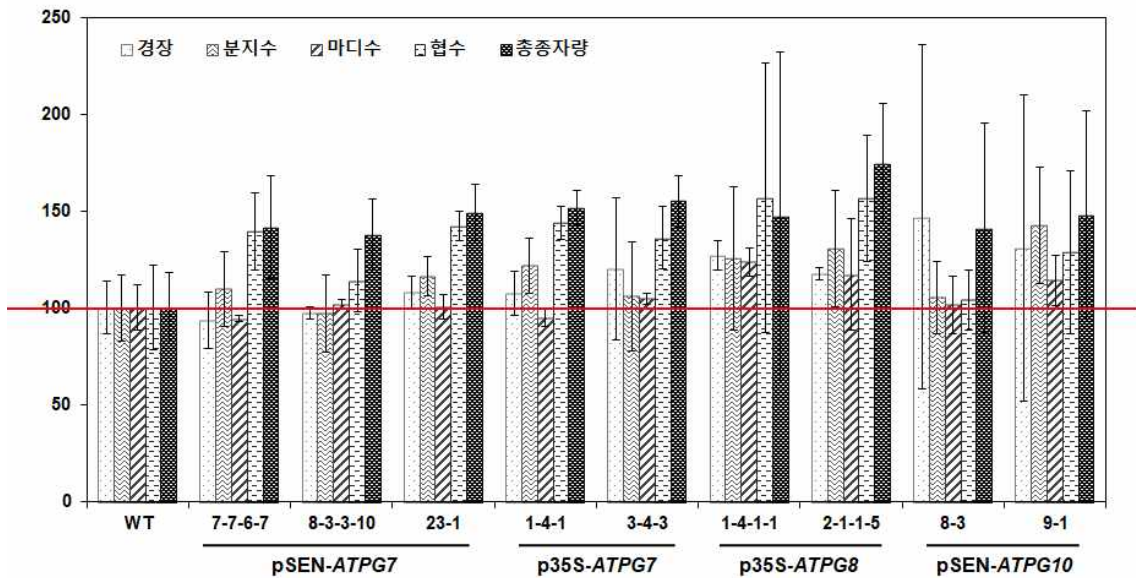


그림 87. ATPGs-콩 우수계통의 생산성 증대관련 농업형질 분석. pSEN-: pCSEN-, p35S-: pB2GW7.0-

## 라. 연구결과 요약

### 유용 유전자 발굴 및 기능 검정

- 기확보 유전자 기능 재검정: *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, *ATPG8* (다수성 형질 재확인 완료)  
AT-hook 유전자의 hormone signaling에 대한 기작 규명
- 다수성 형질 신규 유용 유전자 발굴: *MtATPG1*, *MtATPG2*, *AHL17*, *AHL22*, *AMTG1*, *GmATPGs*(9종)

### 콩 형질전환체 생산 및 기능검정(유전자 도입/발현 분석, 포장 전개)

유전자	기확보 유용 유전자				신규 유용 유전자						
	<i>ATPG3</i>	<i>ATPG4</i>	<i>ATPG7</i>	<i>ATPG8</i>	<i>MtATPG1</i>	<i>MtATPG2</i>	<i>AHL17</i>	<i>AHL22</i>	<i>AMTG1</i>	<i>GmATPGs</i>	
벡터 제작	pB2GW7.0	●	●	●	●	●	●	●	●	▲	▲
	pCSEN	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
형질전환	●	●	●	●	●	●	●	●	●	▲	▲
T ₀ 형질전환체 생산	●	●	●	●	●	●	●	●	●	▲	▲
형질전환체의 유전자 도입/ 발현 분석	●	●	●	●	●	●	●	●	●	▲	
T ₁ 형질전환 종자 수확	●	●	●	●	●	●	●	●	●		
형질전환체 포장 전개	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲		
다수성 우수계통 선별			5	2			2				

●: 완료, ▲: 진행 중



## 제 5 절. 연구개발 성과

### 가. 연구성과 목표 및 대비실적

(단위 : 건수)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용-홍보		기타(타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
											SCI	비SCI	정책활용		홍보전시				
최종목표	9	6										3							
1차년도	목표	2	0																
	실적	3	2										1			2			
2차년도	목표	3										1							
	실적	4										1				2			
3차년도	목표	2	1									1							
	실적	1	1											2			1		
4차년도	목표	2	1									1							
	실적	2										1		3					
5차년도	목표		4																
	실적	3										1	2	1					
합계	목표	9	6									3							
	실적	13	3									3	3	6		4		1	

## 나. 국·내외 논문게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부	게재일	등록번호
1	Overexpression of <i>AtSZF2</i> ^{a)}	Plant Breed. Biotech.	MJ Kim	5(1):1-15	대한민국	Korean Society of Breeding Science	비SCI	2017	
2	Overexpression of a Chromatin ^{b)}	Plant Breed. Biotech.	HJ Kim	5(3): 237-242	대한민국	Korean Society of Breeding Science	비SCI	2017	
3	Enhancement of syringin contents ^{c)}	Plant Biotechnol. Rep.	TM Kwon	11: 439-447	Japan	Korean Soc for Plant Biotech and Springer Japan	SCI	2017	
4	RNAi-mediated ^{d)}	Plant Biotechnol Rep	HJ Kim	10: 257-267	Japan	Korean Soc for Plant Biotech and Springer Japan	SCI	2016	
5	Expression of gibberellin ^{e)}	J Plant Biol.	DH Lee	57: 106-116	대한민국	Korean Society of Plant Biologists	SCI	2014	
6	Development of Near-isogenic ^{f)}	Plant Breed. Biotech.	JH Pak	1(2): 122-130	대한민국	Korean Society of Breeding Science	비SCI	2013	

a) Overexpression of *AtSZF2* from *Arabidopsis* Showed Enhanced Tolerance to Salt Stress in Soybean (2017, 5차년도)

b) Overexpression of a Chromatin Architecture-Controlling *ATPG7* has Positive Effect on Yield Components in Transgenic Soybean (2017, 5차년도)

c) Enhancement of syringin contents in soybean seeds with seed-specific expression of a chimeric *UGT72E3/E3* gene (2017, 5차년도)

d) RNAi-mediated Soybean mosaic virus (SMV) resistance of a Korean soybean cultivar (2016, 4차년도)

e) Expression of gibberellin 2-oxidase 4 from *Arabidopsis* under the Control of a Senescence-associated Promoter Results in a Dominant Semi-dwarf Plant with Normal Flowering (2014, 2차년도)

f) Development of Near-isogenic Transgenic Rice Lines Harboring wild Rice (*Oryza grandiglumis*)-derived Fungal Resistance Gene (*OgPRT*) (2013, 1차년도)

## 다. 국·내외 학술대회 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국대사체학회 정기학술대회: Metabolic engineering of soybean by genetic transformation	정영수	2015.04.03	부산	대한민국
2	한국육종학회 국제심포지움: Transformation of soybean with AT-hook binding protein genes to delay senescence	조현석 등	2015.07.01	부산	대한민국
3	한국식물생명공학회 정기학술대회: Transformation of soybean with improved agricultural traits of insect resistance and drought tolerance	김재성 등	2016.06.09	부산	대한민국
4	한국식물생명공학회 정기학술대회: Probing high-yield traits of soybean by transforming senescence-delay genes	조현석 등	2016.06.09	부산	대한민국
5	한국식물학회 정기학술대회: Regulated expression of <i>MtATPG1</i> confers yield improvement and senescence delay in <i>Arabidopsis</i>	김국진 등	2016.11.03	부여	대한민국
6	한국식물생명공학회 정기학술발표회: Expression of <i>MtATPG2</i> regulates yield improvement and delayed leaf senescence in <i>Arabidopsis</i>	김국진 등	2017.06.08	대전	대한민국

## 라. 지식재산권: 특허출원/등록

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	식물의 생산성 ^{a)}	국제(PCT)	제노마인(주)	2013.02	PCT/KR2013/001311				70
2	식물의 염 스트레스 ^{b)}	대한민국				동아대	2013.05	10-1270231	50
3	식물의 생산성 ^{c)}	대한민국	제노마인(주)	2013.06	10-2013-0075018				60
4	식물의 생산성 ^{d)}	대한민국	제노마인(주)	2013.06	10-2013-0075022				40
5	<i>AtSIZ</i> 형질전환 ^{e)}	대한민국				한국생명공학연구원	2013.11	10-1329157	25
6	식물의 생산성 ^{f)}	대한민국	제노마인(주)	2014.06	10-2014-0079259				50
7	식물의 생산성 ^{g)}	대한민국	제노마인(주)	2014.06	PCT/KR2014/005750				50
8	식물의 생산성 ^{h)}	대한민국	제노마인(주)	2014.06	PCT/KR2014/005700				50
9	<i>ORE7</i> 유전자를 ⁱ⁾	대한민국	제노마인(주)	2014.10	10-2014-0132324				30
10	식물 왜화 유도 ^{j)}	대한민국				제노마인(주)	2015.09	10-1556927	100
11	<i>ORE7</i> 유전자를 ^{k)}	국제(PCT)	제노마인(주)	2015.10	PCT/KR2015/010375				100
12	식물의 생산성 증대 ^{l)}	대한민국	제노마인(주)	2016.10	10-2016-0129693				50
13	식물의 생산성 증대 ^{m)}	대한민국	제노마인(주)	2016.10	10-2016-0129696				100
14	식물의 생산성 증대 ⁿ⁾	국제(PCT)	제노마인(주)	2017.09	PCT/KR2017/010855				50
15	식물의 생산성 증대 ^{o)}	국제(PCT)	제노마인(주)	2017.09	PCT/KR2017/010859				50
16	식물의 생산성 증대 ^{p)}	대한민국	제노마인(주)	2017.12	10-2017-0168525				50

a) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG3 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 (기여도 70%), 1차년도

b) 식물의 염 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 *AtSZF2* 유전자 및 이의 용도 (기여도 50%), 1차년도

c) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG6 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 (기여도 60%), 1차년도

d) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG10 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 (기여도 40%), 1차년도

e) *AtSIZ* 형질전환 콩 6번 사상의 도입 유전자 위치 및 이의 이용 방법 (기여도 25%), 1차년도

f) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG6 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 (기여도 50%), 2차년도

g) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG6 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 (기여도 50%), 2차년도

h) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG10 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 (기여도 50%), 2차년도

i) *ORE7* 유전자를 이용한 식물 생산성 증대 방법, 식물 스트레스 내성 강화 방법 및 식물 노화 지연 방법 (기여도 30%), 2차년도

j) 식물의 왜화 유도 기능을 가진 폴리펩티드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 용도 (기여도 100%), 3차년도

- k) *ORE7* 유전자를 이용한 식물 생산성 증대 방법, 식물 스트레스 내성 강화 방법 및 식물 노화 지연 방법 (기여도 100%), 3차년도
- l) 식물의 생산성 증대 기능과 노화 지연 기능을 갖는 MtATPG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 (기여도 50%), 4차년도
- m) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 MtATPG2 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 (기여도 100%), 4차년도
- n) 식물의 생산성 증대 기능과 노화 지연 기능을 갖는 MtATPG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 (기여도 50%), 5차년도
- o) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 MtATPG2 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 (기여도 50%), 5차년도
- p) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 AHL26 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 (기여도 50%), 5차년도

### 마. 인력양성

연구인력 활용/양성 성과													
번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	인력지원 성과	2013, 2014	4				2	2			4		

### 바. 정책활용·홍보

#### 1) 홍보전시

전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)					
번호	유형	행사명	전시품목	장소	활용년도
1	전시회	생명산업대전	형질전환된 콩 종자	일산 킨텍스	2014.11.26



# 제 4 장. 목표달성도 및 관련 분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

## 제 1 절. 목표달성도

### 가. 목표달성도

연구 개발 최종 목표	연구 개발 내용	달성도(%)
Chromatin architecture 조절을 통한 다수성 형질관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (10종)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 기 확보된 유용 유전자의 기능 재검정 및 추가 기능 검정 완료 (ATPG3, ATPG4, ATPG7, ATPG8, 4종)</li> <li>· Chromatin architecture 조절을 통한 다수성 형질관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (14종)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Medicago truncatula</i>로부터 다수성 형질을 가지는 <i>MtATPG1</i>과 <i>MtATPG2</i> 발굴 및 기능 검정</li> <li>- 애기장대로부터 다수성 형질을 가지는 <i>AHL17</i>과 <i>AHL22</i> 발굴 및 기능 검정</li> <li>- 애기장대로부터 다수성 형질을 가지는 <i>AMTG1</i> 발굴 및 기능 검정</li> <li>- 애기장대 AT-hook 유전자와 homology를 갖는 콩 <i>GmATPGs</i> 분리 및 기능 검정 진행 중 (9종)</li> </ul> </li> </ul>	>100
유용 유전자가 도입된 콩 형질전환체 생산 (10건)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 유용 유전자의 콩 도입 벡터 construct 제작 (18건)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>ATPG3, ATPG4, ATPG7, ATPG8, AHL17, AHL22, MtATPG1, MtATPG2</i> (각 유전자 당 적용 벡터 2건: pB2GW7.0 and pCSEN-IF), <i>AMTG1</i> (pCSEN-IF 벡터 1건)</li> <li>- <i>GmATPGs</i> 9종 (각 유전자 당 적용 벡터 2건: pENTR and pCSEN-IF)</li> </ul> </li> <li>· 유용 유전자의 콩 도입 및 형질전환체 생산 (18건)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 콩 형질전환: <i>ATPG3, ATPG4, ATPG7, ATPG8, AHL17, AHL22, MtATPG1, MtATPG2, AMTG1, GmATPGs</i> 9종</li> <li>- 형질전환 콩의 1차 기능 분석: 유전자 도입(단일 유전자 도입 확인) 및 발현 분석</li> <li>- 콩 형질전환체 생산</li> </ul> </li> </ul>	>100
콩 형질전환체의 기능분석(7종 이상)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 기능 분석을 통하여 다수성 목표형질을 지닌 우량 형질전환체 개발 (유전자 8종)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 형질전환 콩의 1차 표현형 분석(유전자 8종)</li> <li>- 형질전환 콩의 온실 및 포장 검정을 통한 농업 형질 규명</li> <li>- 우량 형질전환체 세대 전개 (유전자 8종)</li> </ul> </li> </ul>	>100
우량 형질전환체의 세대 전개 및 후대 검정 (농업형질: $\geq 120\%$ 종자수확량, 2종)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 종자 확보 및 후대 검정: 9종의 우수계통(이벤트) 확보               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 선발된 콩 형질전환체의 GMO 포장시험에서 3-4세대 전개를 통한 농업형질 규명</li> <li>- 우량 형질전환 계통(농업형질: $\geq 120\%$ 종자수확량) 17종 선별</li> <li>- 다수성 농업형질 우수계통(농업형질: $\geq 135\%$ 종자수확량) 9종 선별</li> </ul> </li> </ul>	>100
우량 형질전환체의 GM 작물 실용화 탐색	<ul style="list-style-type: none"> <li>· GM 작물 실용화 탐색:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 다수성 농업형질 우수계통(농업형질: $\geq 135\%$ 종자수확량) 9종 선별</li> <li>- 특허 회피 벡터 제작, 벡터 시스템 점검 등</li> </ul> </li> </ul>	>100
특허 및 논문 등 지적 소유권 확보 (18건)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 특허출원/등록 16건</li> <li>· 논문: 6건 (SCI 학술지 3건)</li> </ul>	>100

## 나. 연차별 목표달성도

### 1) 1차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1차 년도 (2012)	다수성 콩 품종 개발용 유용 유전자 발굴	기확보 유전자의 기능 재검정 (4종)	다수성 형질 관련 기확보 유전자의 기능 재 검정 및 추가 기능 검정: <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> (총 4종)	100
		유용 유전자 2종 발굴	다수성 형질 관련 신규 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (4종)  - <i>Medicago truncatula</i> 로부터 다수성 형질을 가지는 <i>MtATPG1</i> 과 <i>MtATPG2</i> 발굴 및 기능 검정  - 애기장대로부터 다수성 형질을 가지는 <i>AHL17</i> 과 <i>AHL22</i> 발굴 및 기능 검정	200
		콩 형질전환용 벡터 제작 (6종)	기확보 유전자 4종에 대한 콩 형질전환용 벡터 제작 (각 유전자 당 적용 벡터 2건: <i>pB2GW7.0</i> and <i>pCSEN-IF</i> )  - <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i>  신규 유용 유전자 4종에 대한 콩 형질전환 용 벡터 제작 ( <i>pCSEN-IF</i> 벡터)  - <i>AHL17</i> , <i>AHL22</i> , <i>MtATPG1</i> , <i>MtATPG2</i>	130
	다수성 우량 콩 형질전환체 개발	콩 형질전환체 4종 생산	기확보 유전자 <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> 그 리고 <i>ATPG8</i> 에 대한 콩 형질전환 및 형질전 환체 생산 (4종)  - 콩 형질전환: <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> 그 리고 <i>ATPG8</i> 에 대하여 유전자당 2건의 벡 터를 적용하여 콩 형질전환 (4종)  - 형질전환체 생산: <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> 그리고 <i>ATPG8</i> 에 대하여 유전자당 2건의 벡터를 도입한 콩 형질전환체 생산 (4종)  - 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석: 3종의 유전자, <i>ATPG3</i> , <i>ATPG7</i> 그리고 <i>ATPG8</i> 에 대한 PCR, RT-PCR 혹은 qRT-PCR 등을 수행하여 형질전환체 분석 (3종)  - 형질전환체의 종자 생산: 3종의 유전자, <i>ATPG3</i> , <i>ATPG7</i> 그리고 <i>ATPG8</i> 에 대한 T ₁ 형질전환 종자 수확 (3종)	100

## 2) 2차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
2차 년도 (2013)	[1세부] 다수성 콩 품종 개발용 유용 유전자 발굴	기확보 유전자의 기능 재검정	기확보 유전자의 기능 재검정 (총 4종, 1차 년도) 기확보 유전자의 추가 기능 분석: 유전자 발 현 조절 및 cytokinin signaling에 대한 기작 분석 (1~2차년도)	추가 진행
		유용 유전자 2종 발굴 (총 4종, 1~2차년도)	다수성 형질 관련 신규 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (총 5종, 1~2차년도) - <i>Medicago truncatula</i> 로부터 다수성 형질을 가지는 <i>MtATPG1</i> 과 <i>MtATPG2</i> 발굴 및 기능 검정 - 애기장대로부터 다수성 형질을 가지는 <i>AHL17</i> 과 <i>AHL22</i> 발굴 및 기능 검정 - 애기장대로부터 다수성 형질을 가지는 <i>AMTG1</i> 발굴 및 기능 검정	120
		신규 유용 유전자에 대한 콩 형질전환용 벡터 제작 (4종)	신규 유용 유전자 4종에 대한 콩 형질전환 용 벡터 제작 (각 유전자 당 적용 벡터 2건: pB2GW7.0 and pCSEN-IF) - <i>AHL17</i> , <i>AHL22</i> , <i>MtATPG1</i> , <i>MtATPG2</i>	150
	[1협동] 다수성 우량 콩 형질전환체 개발	신규 유전자에 대한 콩 형질전환체 4종 생산 (총 8종, 1~2차년도)  콩 형질전환체 기능 검정	기확보 유전자 4종 및 신규 유전자 4종 에 대한 콩 형질전환 및 형질전환체 생산 (총 8종, 1~2차년도) - 형질전환체 생산: 기확보 유전자 <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> , 그리고 신규 유 전자 <i>AHL17</i> , <i>AHL22</i> , <i>MtATPG1</i> , <i>MtATPG2</i> 에 대하여 콩 형질전환체 생산 (8종) - 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석: 생산된 형질전환체에 대한 PCR, RT-PCR 혹은 qRT-PCR 등을 수행하여 형질전환체 분석 중 - 형질전환체의 종자 생산: 생산된 형질전환 체로부터 T ₁ 형질전환 종자 수확 진행 중  형질전환체 기능 검정 - 1차년도 생산 콩 형질전환체 4종에 대한 1 차 기능 검정 - 1차년도 생산 콩 형질전환체 3종에 대한 포장 전개	100

### 3) 3차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
3차 년도 (2014)	[1세부] 다수성 콩 품종 개발용 유용 유전자 발굴	기확보 유전자의 기능 재검정	기확보 유전자의 기능 재검정 (총 4종, 1차 년도) 기확보 유전자의 추가 기능 분석: 유전자 발 현 조절 및 cytokinin signaling에 대한 기작 분석 (1~3차년도)	추가 진행
		유용 유전자 1종 발굴 (총 5종, 1~3차년도)	다수성 형질 관련 신규 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (총 5종이상, 1~3차년도) - <i>Medicago truncatula</i> 로부터 다수성 형질을 가지는 <i>MtATPG1</i> 과 <i>MtATPG2</i> 발굴 및 기능 검정 - 애기장대로부터 다수성 형질을 가지는 <i>AHL17</i> 과 <i>AHL22</i> 발굴 및 기능 검정 - 애기장대로부터 다수성 형질을 가지는 <i>AMTG1</i> 발굴 및 기능 검정 - 애기장대 AT-hook 유전자와 homology를 가지는 콩 <i>GmATPGs</i> 분리 및 기능 검정 진행 중 (9종)	>100
		신규 유용 유전자 1종에 대한 콩 형질전환용 벡터 제작 (총 5종)	신규 유용 유전자 5종 및 콩 homology ( <i>GmATPGs</i> )에 대한 콩 형질전환용 벡터 제 작 (총 14종, 1~3차년도) - <i>AHL17</i> , <i>AHL22</i> , <i>MtATPG1</i> , <i>MtATPG2</i> (각 유전자 당 적용 벡터 2건: pB2GW7.0 and pCSEN-IF) - <i>AMTG1</i> (pCSEN-IF 벡터 1건) - <i>GmATPGs</i> 9종 (각 유전자 당 적용 벡터: pCSEN-IF 벡터 9건)	>100
	[1협동] 다수성 우량 콩 형질전환체 개발	신규 유전자에 대한 콩 형질전환체 1종 생산 (총 9종, 1~3차년도)	기확보 유전자 4종 및 신규 유전자 5종 에 대한 콩 형질전환 및 형질전환체 생산 (총 9종, 1~3차년도) - 형질전환체 생산: 기확보 유전자 <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> 및 신규 유전자 <i>AHL17</i> , <i>AHL22</i> , <i>MtATPG1</i> , <i>MtATPG2</i> 에 대하여 콩 형질전환체 생산 (8종), 그리고 신규 유전자 <i>AMTG1</i> 에 대한 콩 형질전환 및 형질전환체 생산 진행 (1종) - 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석: 생산된 형질전환체에 대한 PCR, RT-PCR 혹은 qRT-PCR 등을 수행하여 형질전환체 분석 중 - 형질전환체의 종자 생산: 생산된 형질전환 체로부터 T ₁ 및 T ₂ 형질전환 종자 수확 진행 중	100

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
	[협동] 다수성 우량 콩 형질전환체 개발	콩 형질전환체 기능 검정	형질전환체 기능 검정 (총 8종, 1~3차년도) - 1차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 2차 기능 검정 - 2차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 1차 기능 검정	100
		포장 시험	우량 콩 형질전환체의 농업적 특성 분석 (총 4종) - 포장 전개 및 증식 - 수확 조사	>100



#### 4) 4차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
4차 년도 (2016)	[1세부] 다수성 콩 품종 개발용 유용 유전자 발굴	기확보 유전자의 기능 재검정	기확보 유전자의 기능 재검정 (1~3차년도) 기확보 유전자의 추가 기능 분석: 유전자 발현 조절 및 cytokinin signaling에 대한 기작 분석	추가 진행
		유용 유전자 1종 발굴 (총 6종)	다수성 형질 관련 신규 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (총 14종, 1~4차년도) - <i>Medicago truncatula</i> 로부터 다수성 형질을 가지는 <i>MtATPG1</i> 과 <i>MtATPG2</i> 발굴 및 기능 검정 - 애기장대로부터 다수성 형질을 가지는 <i>AHL17</i> 과 <i>AHL22</i> 발굴 및 기능 검정 - 애기장대로부터 다수성 형질을 가지는 <i>AMTG1</i> 발굴 및 기능 검정 - 애기장대 AT-hook 유전자와 homology를 갖는 콩 <i>GmATPGs</i> 분리 및 기능 검정 진행 중 (9종)	>100
		신규 유용 유전자 1종에 대한 콩 형질전환용 벡터 제작 (총 6종)	신규 유용 유전자 5종 및 콩 homology ( <i>GmATPGs</i> )에 대한 콩 형질전환용 벡터 제 작 (총 14종 18건, 1~4차년도) - <i>AHL17</i> , <i>AHL22</i> , <i>MtATPG1</i> , <i>MtATPG2</i> (각 유전자 당 적용 벡터 2건: pB2GW7.0 and pCSEN-IF) - <i>AMTG1</i> (pCSEN-IF 벡터 1건) - <i>GmATPGs</i> 9종 (각 유전자 당 적용 벡터 2건: pENTR and pCSEN-IF)	>100
	[1협동] 다수성 우량 콩 형질전환체 개발	신규 유전자에 대한 콩 형질전환체 1종 생산 (총 10종, 1~4차년도)	기확보 유전자 4종 및 신규 유전자 6종 이 상에 대한 콩 형질전환 및 형질전환체 생 산 (총 10종 이상, 1~4차년도) - 형질전환체 생산 및 기능 검정: 기확보 유전자 <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> 및 신규 유전자 <i>AHL17</i> , <i>AHL22</i> , <i>MtATPG1</i> , <i>MtATPG2</i> 에 대하여 콩 형질 전환체 생산 및 기능 검정(8종) - 형질전환 및 형질전환체 생산: 신규 유전 자 <i>AMTG1</i> 에 대한 콩 형질전환 및 형질 전환체 생산 (1종), 그리고 신규 유전자 군 <i>GmATPGs</i> 9종에 대해 순차적으로 콩 형질전환 및 형질전환체 생산 진행 (1종 이상)	>100

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
4차 년도 (2016)	[1협동] 다수성 우량 콩 형질전환체 개발		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석: 생산된 형질전환체에 대한 PCR, RT-PCR 혹은 qRT-PCR 등을 수행하여 형질전환체 분석 중</li> <li>- 형질전환체의 종자 생산: 생산된 형질전환체로부터 세대 진전을 통하여 후대(T₁, T₂, T₃ 등) 형질전환 종자 수확 진행 중</li> </ul>	
		콩 형질전환체 기능 검정 (주관공동) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 포장시험</li> <li>- 2차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 2차 기능 검정</li> <li>- 3차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 1차 기능 검정</li> </ul>	콩 형질전환체 기능 검정 (총 8종, 1~4차년도) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1차년도 생산 콩 형질전환체 4종에 대한 포장시험</li> <li>- 2차년도 생산 콩 형질전환체 4종에 대한 2차 기능 검정 및 3라인에 대한 포장 시험</li> <li>- 3차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 1차 기능 검정</li> </ul>	>100
		우량 콩 형질전환체의 농업적 특성 분석 (포장시험) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 포장 전개 및 증식</li> <li>- 수확 조사</li> </ul>	7종의 형질전환체에 대하여 포장 전개 후 수확조사 완료 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 포장 전개 및 증식</li> <li>- 수확 조사</li> </ul>	>100

5) 5차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
5차 년도 (2017)	[1세부] 다수성 콩 품종 개발용 유용 유전자 발굴	유용 유전자 추가 기능 검정	기확보 유전자 및 신규 발굴 유전자의 추가 기능 검정 - <i>ATPGs</i> 유전자들의 hormone signaling에 대한 기작 분석 - <i>GmATPGs</i> 에 대한 기능 검정	추가 진행
	[1협동] 다수성 우량 콩 형질전환체 개발	콩 형질전환체 기능 검정 (주관 공동)	콩 형질전환체 기능 검정 (총 8종) - 1차년도 생산 콩 형질전환체 4종에 대한 포장시험 - 2차년도 생산 콩 형질전환체 4종에 대한 2차 기능 검정 및 3라인에 대한 포장 시험 - 3차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 1차 기능 검정 - 4차년도 생산 콩 형질전환체에 대한 1차 기능 검정 8종의 형질전환체에 대하여 포장 전개 후 수확조사 완료 - 포장 전개 및 증식 - 수확 조사	>100
	GM 작물 실용화 연구: 2종 우량 형질전환체 개발	우수계통 9종 선별: 3-4차례의 농업형질 분석을 통한 $\geq 135\%$ 수량성을 가진 계통 - 17종의 우량 형질전환 라인 선별 (농업형질: $\geq 120\%$ 이상 종자수확량) - 9종의 우수계통(이벤트) (농업형질: $\geq 135\%$ 이상 종자수확량) - 포장 전개 및 증식 - 수확 조사	>100	

## 제 2 절. 관련분야 기여도

### 가. 연구개발 결과의 활용방안

Chromatin architecture 조절기술을 통한 다수성 형질 관련 유용 유전자의 발굴 및 기능 검정을 수행하여 이에 대한 지적소유권을 우선 확보하고, 본 유전자들에 대한 기술이전을 통하여 경제적 이익을 추구할 것이다. 이때 유전자의 기능을 강화하기 위하여 관련 전공자(식물 생리·생화학자 등)와의 공동연구를 적극 추진할 것이며, 이러한 연구 결과는 유용 유전자의 기술 이전에 있어서 보다 부가가치를 높일 것이다.

본 사업을 통해 개발된 다수성 농업 형질을 나타내는 우량 콩 형질전환체와 GM 콩 우수 계통은 이후 우수계통 육성 및 안정성 평가 등을 추진하여 다수성 GM 콩 품종 개발을 완성하고자 한다. 한편 본 사업에 적용한 유전자는 다수성 및 생산성 증대 형질의 제공에 있어서 폭넓은 식물 스펙트럼을 가지므로 타 경제작물 개발에도 적용이 가능하리라 기대된다. 일례로 선형연구에서 적용된 AT hook domain을 가진 *ORE7*의 경우 잔디에서 tiller 수의 증가를 유발하여 생산성 증대 표현형질을 제공하였다. 이러한 사실은 본 사업에 적용하는 유용 유전자는 쌍자엽 및 단자엽 식물에도 형질 발현을 나타내므로 단자엽의 주요 작물에도 적용이 가능하리라 판단된다.

개발되는 다수성 GM 콩 품종은 벡터에 있어서 pSENIF 벡터와 같은 특허 최소화 벡터 적용 가능 및 유전자에 대한 지적소유권 확보로 특허에 대한 문제점을 최소화할 수 있어 작물의 실용화에 유익하게 활용할 수 있다. 또한 BASF, 몬산토, 신젠타 등 다국적기업의 최근 종자개발 전략과 일치하므로 해외 진출에 있어 많은 장점을 가질 수 있을 것이다.

유전자 발굴부터 형질전환체 생산, 재배 및 포장 검정에 이르는 완전한 일련의 분자육종체계를 확립하여 모델링함으로써 분자육종의 모델로 활용할 수 있을 것이다.

### 나. 기대성과

#### 1) 기술적 측면

Chromatin architecture 조절기술을 통한 다수성 형질 관련 유용 유전자는 유전자의 발현 조절에 따라 다수성 형질과 녹화 연장의 두 가지 뚜렷한 표현형적 특징을 제공한다. 작물 개발에 있어서 본 유전자의 적용은 녹화 연장 형질, 그리고 다수성 형질 등 적용 작물의 특성에 따라 개발할 수 있다는 장점을 제공한다. 따라서 다수성 형질 관련 유용 유전자에 대한 지적소유권의 확보는 다양한 작물의 개발이 가능하게 하고, 경제적으로 고부가 가치 창출이 가능하게 하며, 향후 국가 농업생명공학 산업의 경쟁력을 가지는데 일조할 것이다.

세부적으로 보면 chromatin architecture 조절 관련 유용 유전자의 발굴 및 기능 검정은 식물의 노화 현상과 다수성 형질에 대한 상관관계를 규명하는데 대한 분자적 기작 해명의 전기를 만들고, 다른 작물의 개발 형질에 따라 노화 조절, 스트레스 저항성 조절, 혹은 다수성 형질 조절기술의 개방 등 광범위한 파급 효과가 있을 것이다.

그리고 본 사업을 통하여 확보되는 고효율 형질전환 기술 및 우량 형질전환체 개발 시스템 확립은 관행 교잡 육종에 생명공학기법을 접목한 새로운 분자유종기술의 기초로 활용할 수 있을 것이다.

본 사업을 통하여 확보된 다수성 형질 관련 유전자의 발굴 및 기능 검증, 그리고 다수성 농업 형질을 나타내는 우량 콩 형질전환체 개발은 지적소유권 확보 후 Science, Plant Cell, Plant J, Nature biotech 등과 같은 우수 논문 발표가 가능할 것이다.

## 2) 경제·산업적 측면

최근 20년간의 형질전환기술에 있어서 유전자 재조합 및 형질전환 식물체 개발에 대한 특허 출원 현황을 조사해 보면, 우리나라는 최근 많은 건수의 특허출원을 하였지만 여전히 미국의 약 10%정도에도 미치지 못 하고 있는 실정이다. 따라서 본 과제의 다수성 형질 제공에 있어 탁월한 기능을 가지는 유용 유전자의 발굴 및 형질전환체의 개발은 일차적으로 식물 유전자를 독점하여 세계 식물 생명공학 사업을 독점적으로 운영하고자 하는 다국적 기업을 견제할 수 있으며, 식물 생명공학에 대한 국가 간의 경쟁력을 강화시키는데 일조할 것이다. 유전자 변형 작물 재배규모가 1996년 이후 지속적인 성장세를 나타내고 있고 그 시장 규모 또한 기하급수적으로 증가할 것으로 추정된다. 따라서 식물의 다수성 형질 관련 유용 유전자를 통한 주요 작물의 개발은 유전자의 잠재 시장과 신품종 혹은 신기능성 작물 시장, 두 가지 분야에 모두 관여 할 수 있기 때문에 엄청난 경제적 이익을 제공할 것이다.

본 과제를 통한 다수성 우량 콩 품종 개발은 다수성 형질 획득 ORE7-콩 형질전환체 개발 사례에서와 같이 *ORE7*과 같은 특정 domain을 가진 유전자의 적용도 가능하게 한다. 따라서 확보 또는 본 사업을 통하여 발굴되는 이러한 특정 domain을 가지는 유전자들의 적용은 보다 형질이 우수하고 다양한 콩 품종 개발을 가능하게 함으로써, 유전자에 대한 기술이전, 개발된 품종에 대한 해외시장 진출, 그리고 개발 품종의 기술이전 등 다양한 형태의 실용화가 가능하게 할 것이다. 이러한 실용화의 다양화는 고부가 가치를 창출하고 국익 창출에 일조할 것으로 판단된다.

우량 GM 콩 품종 개발에 대한 우수품종 육성 기술 확립은 국내에서 확보하고 있는 생산성 증대, 스트레스 저항성, 대사물질 축적 등 농업 형질 적용 가능 유전자의 도입을 통하여 기후 변화 대처, 생산 안정성, 다수성 등과 같은 다양한 우량 GM 품종 개발을 가능하게 할 것이다.

다수성 콩 형질전환체는 우량 GM 콩 품종 개발이 가능하게 하며, 이를 국내 농가에 보급하여 고부가가치 창출 및 콩의 안정적 생산에 기여할 것이다.



# 제 5 장. 연구개발결과의 활용계획

코드번호	D-07
------	------

## 제 1 절. 연구개발결과의 활용 계획

Chromatin architecture 조절기술을 통한 다수성 형질 관련 유용 유전자의 발굴 및 기능검정을 수행하여 이에 대한 지적소유권을 우선 확보하고, 본 유전자들에 대한 기술이전을 통하여 경제적 이익을 추구할 것이다. 이때 유전자의 기능을 강화하기 위하여 관련 전공자(식물 생리·생화학자 등)와의 공동연구를 적극 추진할 것이며, 이러한 연구 결과는 유용 유전자의 기술이전에 있어서 보다 부가가치를 높일 것이다.

**학술적 측면에서의 활용 방안:** 본 과제 수행동안 확보된 유전정보 및 다양한 애기장대 변이체들은 본사와의 협의 하에 국내 산·학·연 기관에 보급하여 유전정보 및 변이체를 통한 식물 생장·발달 관련 유용 유전자 발굴에 일조하여 국내 농업생명공학 분야의 발전에 도움을 주고자 한다. 특히 본 과제에서 발굴한 *ATPGs* 유전자들은 생산성 증대와 녹기 연장, 그리고 스트레스 저항성 등 다양한 작용 스펙트럼을 가지고 있으므로 이들에 대한 기작 연구는 농업생명공학 분야의 발전에 일조할 것으로 판단된다.

**신품종 및 신기능성 작물 개발:** 본 사업을 통해 개발된 다수성 농업 형질을 나타내는 우량 콩 형질전환체와 GM 콩 우수 계통은 이후 우수계통 육성 및 안정성 평가 등을 추진하여 다수성 GM 콩 품종 개발을 완성하고자 한다. 이러한 사업 추진전략은 단기적으로는 다수성 콩 우수계통에 대한 기술이전, 그리고 장기적으로는 종자 생산으로 인한 종자 산업화의 활성화 및 고부가가치 창출이 가능할 것으로 예측된다. 한편 본 사업에 적용한 유전자는 다수성 및 생산성 증대 형질의 제공에 있어서 폭넓은 식물 스펙트럼을 가지므로 타 경제작물 개발에도 적용이 가능하리라 기대된다. 흥미로운 점은 본 사업에 적용하는 유용 유전자는 쌍자엽뿐 만 아니라 단자엽 식물에서도 형질이 발현되므로 주요 경제 단자엽 작물에도 적용이 가능하리라 판단된다.

### 가. 산업화 방안

본 과제의 목표는 다수성 형질 관련 유용 유전자를 고효율 형질전환 시스템이 확립되어 있는 콩에 도입하여 다수성 농업 형질을 나타내는 우량 콩 형질전환체 개발에 있으며, 세부적 산업화 방안으로는 다수성 우량 콩 형질전환체를 개발하고, 개발된 우량 형질전환체의 GM 작물 실용화를 통한 산업화이다. 발굴된 유전자와 개발된 우량 형질전환체의 산업화는 우선 유전자 혹은 형질전환체에 대한 지적소유권을 확보한 후, 마케팅 홍보를 진행한 후 지적소유권의 기술이전이라는 단기 사업 전략과 신품종 개발 및 종자 생산이라는 장기 사업 전략으로 나눌 수 있으며 그 내용은 다음과 같다.

① **연구산물의 지적소유권 확보:** 본 과제를 통해 확보되는 유전자 혹은 형질전환체에 대한 지적소유권의 확보를 우선으로 한다. 유전자에 대한 지적소유권은 본 사업에서 적용하는 콩뿐만 아니라 타 작물·식량, 원예, 화훼 작물 등-에 대해 폭 넓은 적용 스펙트럼을 가지므로 그 부가 가치는 엄청날 것으로 판단된다. 지적소유권의 기술이전에 대한 기술 마케팅은 사업의 신속성 등을 고려

하여 주관기관인 제노마인(주)에서 사업화를 우선 진행할 것이다.

② **마케팅 홍보:** 우리가 확보한 생산성 증대 목표형질 발현 유전자와 다수성 농업형질을 가지는 콩 형질전환 계통에 대한 기술의 우수성과 차별성을 국내외 학회 및 홍보·전시회에 참가하여 홍보하고자 한다. 본 연구개발을 통해 확보되는 유전자의 다양한 작물에서의 적용 가능성 및 다수성 콩 형질전환 계통 개발 및 선별 기술은 미래원천기술로서 기존의 기술과는 우수성과 차별성을 가져 기술 마케팅에 대한 최대 효과를 가질 수 있으리라 판단된다.

③ **기술이전:** 본 과제를 통하여 발굴된 다수성 형질 관련 유전자와 다수성 우량 콩 형질전환체에 대한 지적소유권에 대한 기술이전은 우선적으로 국내 종자회사를 대상으로 한다. 국외로는 BASF, 몬산토, 신젠타 등과 같은 다국적 종자 기업을 대상으로 한다. 국외에 대한 기술이전은 공동연구와 함께 기술이전이라는 package project로 추진하는 것이 보다 효율성이 높아 이에 대해 중점적으로 기술 마케팅을 수행할 예정이다. 주관기관인 제노마인(주)는 다국적 기업인 BASF와의 유용 유전자에 대한 기술이전을 협약한 바 있다. 이러한 기술 마케팅은 본 사업의 연구산물에 대한 기술이전에 있어 훌륭한 모델이 될 것으로 확신한다.

④ **다수성 우량 콩 품종 개발 및 종자 생산:** 본 사업에서 개발된 우량 형질전환체는 GM 작물 실용화 연구를 통하여 종자 생산 시스템까지 구축하고자 한다. 이러한 시스템의 구축까지는 장시간의 개발 기간이 소요되지만, 개발 성공 시 고부가 가치 창출과 국가 농업생명공학에 대한 경쟁력 확보 등 경제적 그리고 국가 경쟁력에 대한 효용가치가 높은 매력적인 산업이 될 것이다. 하지만 이러한 시스템 구축을 통한 종자 생산은 장시간의 기술 개발 기간과 많은 개발 자금이 소모되므로 벤처기업인 제노마인(주)에서 감당하기엔 힘든 상황이다. 따라서 본 사는 GM 작물의 실용화 연구에서 이벤트 선별 및 안정성/위해성 평가에 대한 부분은 후속 국책과제 혹은 국내 종자회사와의 공동 연구를 통하여 다수성 우량 콩 품종 개발을 수행하고자 한다. 이러한 사업 추진은 고부가 가치 창출과 더불어 국내 콩 공급의 안정화를 제공함으로써 국내 농업의 활성화에 일조할 수 있을 것으로 판단된다.

⑤ 이러한 사업화 계획을 종합해보면 지적소유권의 확보를 통한 기술이전과 더불어 공동연구를 추진하는 project packaged가 가장 타당한 형태의 사업화가 될 것이며, 이러한 사업화 로드맵은 아래 그림과 같다.

⑥ **사업화를 통한 경제적 기대효과:**

(단위 : 백만원)

항 목	산업화 기준	종료 1차년도	종료 2차년도	종료 3차년도	종료 4차년도	종료 7차년도	계
직접 경제효과				1,000 ¹⁾	1,400 ²⁾	3,000 ³⁾	5,400
경제적 파급효과						25,500 ⁴⁾	25,500
부가가치 창출액							
합 계				1,000	1,400	28,500	30,900

¹⁾유전자 기술이전 2건 (5,000백만원/기술이전 1건)

²⁾형질전환체 기술이전 2건 (7,000백만원/기술이전 1건)

³⁾우량 품종 개발완료로 7차년도 기준, 품종 개발을 통한 기술이전 혹은 사업화

⁴⁾우량 품종 개발완료에 따른 외연 확대 적용효과, 7차년도 기준

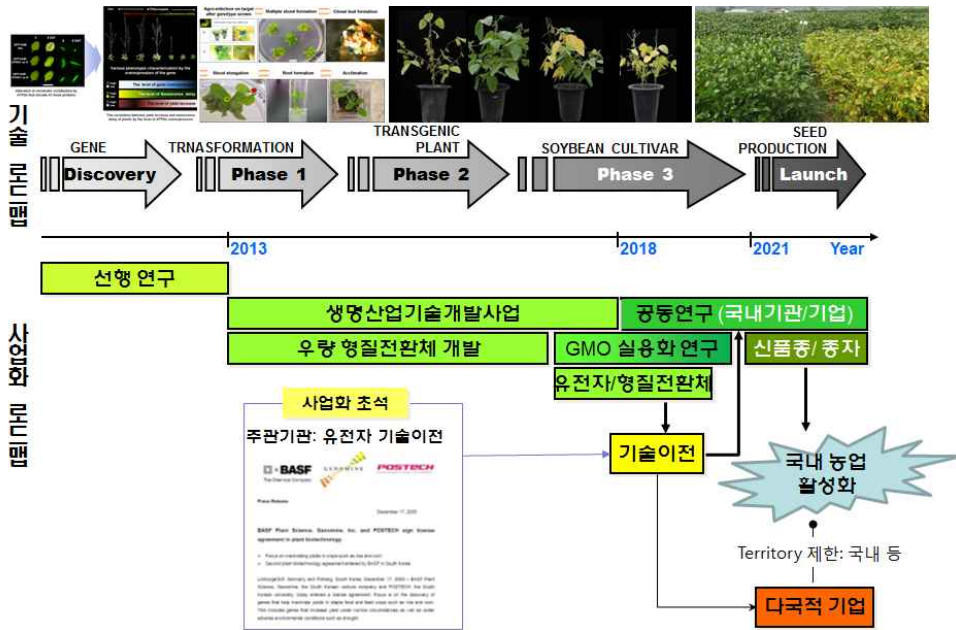


그림. 본 사업을 통한 기술 로드맵과 사업화 로드맵

## 나. 사업화 타당성 분석

콩은 식량 및 사료 작물로서의 중요성뿐만 아니라 바이오에너지 개발과 같은 외연 확대를 통하여 고부가 창출이 가능한 주요 작물이다. 다수성 콩 품종 개발의 사업화 타당성 분석은 일례로 콩의 외연 확대에 대한 사업화 타당성 분석을 아래 그림에서 제시하였다.

### 다수성 형질의 기술개발에 대한 사업화 타당성

- 미국의 경우, 바이오디젤 직접 생산비(자본 비용과 수익을 포함)의 대부분은 원료비로써 콩으로 바이오디젤 1갤런을 생산하기 위해서는 파운드당 20센트인 콩기름 7.3 파운드가 필요하며, 콩으로 만든 바이오디젤의 원료비는 갤런당 적어도 \$1.5 수준
- Soybean oil을 주원료로 바이오디젤을 생산하는 미국의 바이오에너지 회사, SoyMor Biodiesel 사의 연간 바이오디젤 생산능력은 삼천만(30,000,000)갤런
- 미국의 바이오에너지 회사, SoyMor Biodiesel 사의 연간 바이오디젤의 원료비는 \$45,000,000

### 본 사업을 통해 130%이상의 증자수확량 증가 콩 품종을 개발.

- 130%의 증자수확량 증가를 가지는 형질전환체의 개발은 약 77%의 원료비 절감 효과를 가짐
- 따라서 미국의 바이오에너지 회사, SoyMor Biodiesel 사의 연간 바이오디젤의 원료비는 \$34,650,000
- 원료비 절감 효과는 연간 \$10,350,000
- 또한 단위면적당 수확량의 증가는 생산 면적의 감소와 수확 및 수송 비용 등의 생산비 절감 효과를 가짐. 그러므로 원료비 절감 효과는 보다 클 것으로 예상

### 본 개발기술의 사업화는 충분한 타당성과 고부가가치 창출이 가능하리라 판단됨

따라서 상기의 타당성 분석을 통한 다수성 형질의 유전자 도입을 통한 우량 콩 품종 개발에 대한 사업 추진은 고부가 가치 창출과 더불어 국내 농업 활성화 및 발전에 일조할 것으로 판단된다.

## 제 6 장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

### 제 1 절. 콩 시장 규모 및 개발 현황

**전 세계 주요 식량자원으로서의 콩 시장 규모 및 현황:** 콩은 전 세계의 대표적인 식량 작물로서 전 세계 수출입 교역시장 규모는 2008년 기준 약 35,132,368천불(수출 규모)/43,754,644천불(수입 규모)로 매우 큰 시장 규모를 가지고 있다(FAOSTAT, 2011 기준). 이러한 시장 규모는 전 세계 주요 작물중 하나인 옥수수 시장 규모보다 오히려 큰 것으로 알려지고 있다. 그러나 한국 시장 규모는 2008년 기준 약 65천불(수출 규모)/ 791,869천불(수입규모)로 열악한 상황이며, 수출에 비하여 10배 이상의 수입 규모를 가져 심각한 수출입 불균형으로 절대적으로 수입에 의존하는 실정이다(표 1). 콩의 높은 영양, 다양한 산업소재로의 활용 및 사료작물로서의 가치 등 국민 생활에 미치는 중요성을 고려할 때, 현재 국내 콩 자급률은 31.7%로 현저하게 낮으며, 생산기반마저 한반도의 기후변화에 따라 예상되는 가뭄이나 홍수등과 같은 재해에 매우 취약하여 이에 대비한 신품종개발이 이루어 지지 않을 경우, 심각한 수확 감소피해가 예상되어 콩의 생산 부족에 대한 국내에서 안정적 생산 기반 확보가 절실히 필요한 상황이다.

표 1. 전 세계 콩 시장 규모와 재배 면적 및 한국의 시장 규모와 재배 면적 (FAO 통계, 2011, faostat.fao.org)

Year	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
<b>World</b>								
<b>Export value (1000\$)</b>	10772162	15577785	15583852	15789456	16134418	22934556	35132368	33105318
<b>Import value (1000\$)</b>	12295313	17212345	19584314	18967770	17851012	26390203	43754644	35993409
<b>Area Harvested (Ha)</b>	83637497	91593387	92519724	95276367	90131752	96441295	99372337	102386023
<b>Korea</b>								
<b>Export value (1000\$)</b>	51	111	138	89	54	33	65	116
<b>Import value (1000\$)</b>	317995	399203	480300	391449	321381	414664	791869	592158
<b>Area Harvested (Ha)</b>	80447	85270	105421	90248	76267	75242	70265	71422

**GM 콩 시장 규모 및 현황:** 2010년 기준 세계 종자 시장의 40%이상(160억 달러)을 GM 종자 시장이 점유하고 있으며, 2007년 세계시장에서 차지하는 GM 종자의 비중은 약 20%에 불과하였으나, 2015년 이후에는 50% 이상을 차지할 것으로 전망되고 있으며, 또한 GM 작물 재배규모가 1996년 이후 지속적인 성장세를 나타내고 있고 최근의 바이오에너지 작물 개발이 급속도로 진행되면서 그 시장 규모는 기하급수적으로 증가할 것으로 추정된다(그림 1).

콩의 경우도 마찬가지로 전 세계적으로 GM 콩 재배 면적이 기하급수적으로 증가하고 있다. 1997년 GM 콩의 점유율은 전체 콩 재배면적의 7.6%를 나타내었으나 2008년에는 GM 콩의 점유율이 72%를 차지하였다. 미국에서도 마찬가지로 1997년 GM 콩의 점유율은 전체 콩 재배면적의 4%에 불과하였으나 2008년에는 GM 콩의 점유율이 92%를 차지하였다(그림 2). 2011년 기

준으로 보면, 전 세계 11개 국가에서 7천5백만 hectar의 면적에서 GM 콩이 재배되고 있다. 대표적 국가의 GM 콩 재배 면적은 다음과 같다.

- 브라질; 제초제 저항성 콩 (20.6 million hectares in 2011)
- 아르헨티나; 제초제 저항성 콩 (19.1million hectares in 2011)
- 우루과이; 제초제 저항성 콩 (1.1million hectares in 2011)
- 미국; 제초제 저항성 콩 (29.2million hectares in 2011)

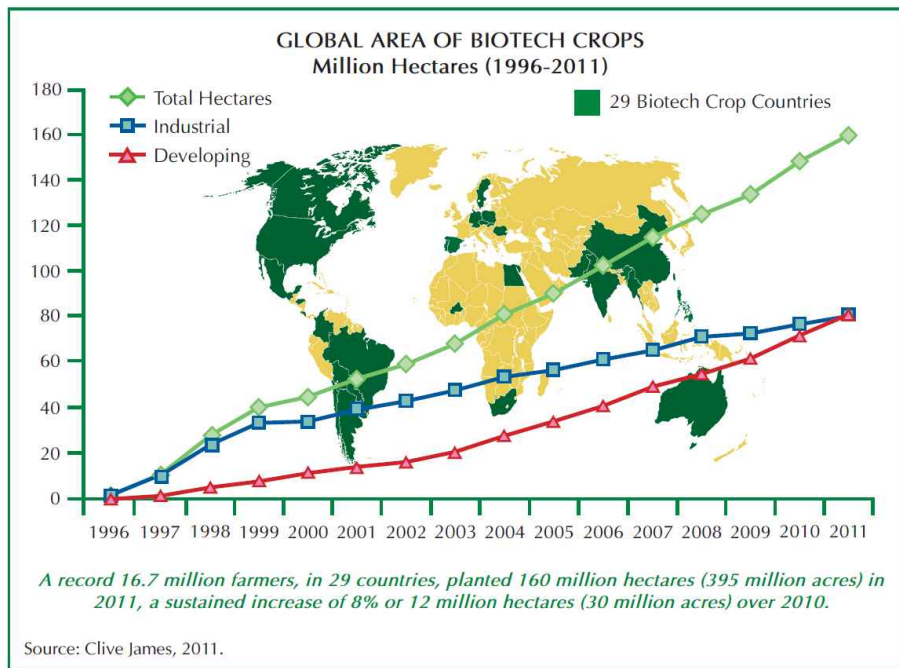


그림 1. Global Area of Biotech Crops (Clive James, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011, ISAAA)



그림 2. 미국 및 전 세계 콩 재배면적에 있어서 GM 콩의 재배 점유율 (Global status of Biotech/GM crops, ISAAA, 2011)

따라서 시장규모의 기하급수적 성장 양상을 보이고 있는 콩은 식량 및 사료 작물의 수입 대체, 수출입 안정화를 통한 시장 안정화 및 재배농가 소득증대 효과까지 제공한다는 점에서 GM 작물의 개발이 상대적으로 많은 장점을 제공하리라 확신하며, 이러한 상황을 종합해 볼 때 GM



콩 개발은 선택이 아닌 필수 사항인 것으로 판단된다.

**콩 형질전환 기술:** 미국은 콩 형질전환 기술 개발을 1980년대부터 시작하여 가장 먼저 형질전환 기술이 확보되었고 상업적으로 이용 가능한 많은 유전자의 도입이 시도되어 생산되고 있다.

확보하고 있는 형질전환 기술을 고효율로 진보시키기 위하여 실험적으로는 대학과 기업체에서 높은 효율의 콩 형질전환 기술개발을 위하여 지속적인 연구가 진행되었고 그 결과 매우 높은 형질전환 기술이 개발되었다(Olhof 등, 2003; Paz 등, 2005).

형질전환용 벡터 개발의 경우, 다국적 기업이 대학 혹은 연구기관과 공동 연구를 통하여 벡터 개발에 집중하고 있으며, 이러한 연구는 모두 특허 등과 같은 지적소유권으로 권리를 확보하고 있다. 따라서 다국적 기업이 확보하고 있는 벡터의 권리를 회피할 수 있는 형질전환용 벡터 시스템의 확보가 필수적이라 할 수 있다.

**GM 작물의 상용화:** 1980년대부터 미국을 중심으로 기술개발이 꾸준히 진행되어 많은 유전자의 도입이 형질전환을 통하여 시도되었고 그 중에서 제초제 저항성(glyphosate)과 해충저항성(BT toxin) 유전자 도입된 콩이 전 세계적으로 보급되어 재배되고 있다(Padgett 등 1995; Stewart 등 1996).

GM 작물 개발에 있어서 GM작물 1세대는 식용/사료작물의 생산성 증대에 중점을 두었으며, 2세대는 바이오연료용 에너지작물의 효율 증대에 집중하고 있고, 향후 3세대는 의약품, 경구 백신 등의 특화된 신기능성 원료로의 개발로 발전해 나갈 것으로 예측된다. 하지만 여전히 식량 및 사료로서의 수요 증가를 해결하기 위해서 다수성 GM 작물 개발에 집중하고 있는 실정이다.



그림 3. Monsanto의 다수성 및 스트레스 저항성 작물 개발에 대한 2030 project.

다국적 종자 기업, 특히 Monsanto와 BASF 등은 경작지 감소, 노동력 부족 및 농약과 비료 등

의 투입비용 증가 현상과 개발도상국가들의 경제성장에 따라 식량 및 사료로서의 수요 증가로 콩을 중심으로 집중적으로 GM 작물 개발을 시도하고 있다(그림 3 참조).

**유전자 발굴 기술:** 농업 선진국 및 다국적 종자 기업들은 우량 콩 품종 개발을 위하여 도입 목표형질로 다수확성, 그리고 기후변화 대응에 집중하여 연구하고 있다.

최근 *Medicago truncatula*와 콩의 게놈 염기서열이 밝혀짐에 따라 급속도로 콩의 유용 유전자 발굴에 대한 연구가 집중되고 있다.

## 제 7 장. 연구개발결과의 보안등급

		코드번호	D-09
보안등급분류	일반과제		
결정사유	해당하지 않음		

## 제 8 장. 연구실 안전조치 이행 실적

코드번호

D-011

### 제 1 절. 연구실 안전조치 이행 실적

#### 가. 주관기관: 제노마인(주)

- 기업의 표준관리시스템(ISO9001)을 통한 참여연구원의 안전교육, 안전사고 방지에 대한 교육
- 기업의 사규에 따라 참여연구원의 보험가입 및 건강검진 실시
- 월1회 이상 연구소 전기 안전점검 실시
- 실험 폐기물은 폐기물 전문업체를 통해 처리
- LMO 처리는 LMO 안전처리 규정에 의거 실시
- 상기 내용 이외의 부분은 본사가 속해 있는 (재)포항테크노파크의 안전관리시스템을 통해 안전조치 이행

#### 나. 협동기관: 동아대학교

- 기술적 위험요소 분석
  - GMO 품종 보유
  - 위험성 화학물질 사용
- 안전관리대책
  - GMO 품종 보관 장소 시건장치 실시 및 폐기 시 고압 멸균 하여 처리
  - 물질안전 보건자료 비치 및 위험물 경고 표지 부착
  - 정기적인 건강검진 실시 (년 1회)
  - 학교 및 실험실 내 안전교육 실시(년 6시간 이상)
  - 화학약품 및 실험실 안전점검 : 소방안전협회(년 1회)
  - 방사선 안전교육 : 원자력안전아카데미 (년 1회)
  - 연구실안전(연구실안전환경관리자 보수교육): 국가연구안전관리본부(1회/2년)
  - 환경(환경기술인 교육): 환경보전협회(1회/3년)
- 연구실 안전점검 실시
  - 연구실안전환경조성에 관한 법률에 의거 연구실 일상점검(1회/일), 정기안전점검(1회/년), 정밀안전진단(1회/2년)을 실시하고 지적사항 발생 시 후속조치 후 결과를 안전관리

실에 제출.

○ 참여 연구원의 안전관련 교육훈련 시행

- 연구실 안전환경조성에 관한 법률 제 18조에 의거, 전 직원에 대한 정기안전교육(1회/반기)을 실시함
- 교육 방법은 온라인 가상대학을 통하여 안전교육(6시간)을 실시하고, 수강 후 시험에 응시하여 10문제 중 6문제 이상 맞춰야 교육 이수로 인정함.

○ 연구 내용 및 결과물 안전 확보

GMO 식물체 및 종자가 있는 곳은 시건장치 설치 및 경고 스티커 부착하고, 정기적으로 참여 연구원들을 대상으로 연구 결과의 안전한 관리를 위한 안전교육 실시

○ 연구실 안전 확보 계획

참여 연구원들이 안전관련 각종 법규, 규정 및 지침을 준수하도록 하며, 요구되는 안전교육 및 훈련 실시하며, 보호 장비 및 응급 키트 비치하였으며 인화성 물질 등은 격리된 곳에 보관한다.

또한 연구실 책임자 및 안전관리 담당자를 지정하여 실험실 안전을 점검한다.



## 제 2 절. LMO 연구시설 및 수입신고 현황

### 가. 주관기관: 제노마인(주)

시설번호	제LML08 - 1041호	안전관리 등급	1등급
수입신고 (최근 1년간)		해당 없음	

### 나. 협동기관: 동아대학교

시설번호	제LML08 - 247호	안전관리 등급	1등급
	제LML08 - 248호		
	제LML08 - 249호		
수입신고 (최근 1년간)		해당 없음	

## 제 9 장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허출원일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	식물의 생산성 증대 ^{a)}	제노마인		국제(PCT)		2014.06.26	중복	
2	특허	식물의 생산성 증대 ^{b)}	제노마인		국제(PCT)		2017.09.28	중복	
3	특허	식물의 생산성 증대 ^{c)}	제노마인		국제(PCT)		2017.09.28	중복	
4	논문	Overexpression of <i>AtSZF2</i> ^{d)}	동아대	교신 저자	Plant Breeding and Biotechnology		2017.03.01	중복	비SCI
5	논문	Overexpression of a Chromatin ^{e)}	동아대	교신 저자	Plant Breeding and Biotechnology		2017.09.01	중복	비SCI

a) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG10 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 (기여도 50%), 출원번호 PCT/KR2014/005700

b) 식물의 생산성 증대 기능과 노화 지연 기능을 갖는 MtATPG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 (기여도 50%), 출원번호 PCT/KR2017/010855

c) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 MtATPG2 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 (기여도 50%), 출원번호 PCT/KR2017/010859

d) Overexpression of *AtSZF2* from *Arabidopsis* Showed Enhanced Tolerance to Salt Stress in Soybean, 5(1):1-15

e) Overexpression of a Chromatin Architecture-Controlling *ATPG7* has Positive Effect on Yield Components in Transgenic Soybean, 5(3):237-242

## 제 10 장. 참고문헌

코드번호	D-014
------	-------

- Aravind L and Landsman D** (1998) AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* **19**, 4413-4421.
- Boccalandro HE, Ploschuk EL, Yanovsky MJ, Sanchez RA, Gatz C and, Casal JJ** (2003) Increased phytochrome B alleviates density effects on tuber yield of field potato crops. *Plant Physiol* **133(4)**, 1539-46.
- Gan, S, Amasino, RM** (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, **270**, 1986-1988.
- Guame't JJ, Teeri JA, Noode'n LD** (1990) Effects of nuclear and cytoplasmic genes altering chlorophyll loss on gas exchange during monocarpic senescence in soybean. *Plant and Cell Physiology* **31**, 1123-130.
- Guo Y, Gan S** (2014) Translational researches on leaf senescence for enhancing plant productivity and quality. *Journal of Experimental Botany* **65(14)**, 3901-913
- He C, Yan J, Shen G, Fu L, Holaday AS, Auld D, Blumwald E and Zhang H** (2005) Expression of an *Arabidopsis* vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field. *Plant Cell Physiol.* **46(11)**, 1848-54.
- Hinchee MAW, Connor-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SJ, Gasser CS, et al.** (1988) Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Nat. Biotechnol.* **6**, 915-922.
- John KMM, Natarajan S, Luthria DL** (2016) Metabolite changes in nine different soybean varieties grown under field and greenhouse conditions. *Food Chem.* **211**, 347-355.
- Kanda T, Sullivan KF and Wahl GM** (1998) Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr. Biol.* **8**, 377-385.
- Kant S, Burch D, Badenhorst P, Palanisamy R, Mason J, Spangenberg G** (2015) Regulated Expression of a Cytokinin Biosynthesis Gene IPT Delays Leaf Senescence and Improves Yield under Rainfed and Irrigated Conditions in Canola (*Brassica napus* L.). *PLoS ONE* **10(1)**, e0116349
- Karimi M, Inze' D, Depicker A** (2002) Gateway™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**, 193-195.
- Kim HJ, Cho HS, Pak JH, Kim KJ, Lee DH, Chung YS** (2017) Overexpression of a Chromatin Architecture-Controlling *ATPG7* has Positive Effect on Yield Components in Transgenic Soybean. *Plant Breed. Biotech.* **5(3)**, 237-242
- Kim HJ, Kim MJ, Pak JH, Im HH, Lee DH, Kim KH, et al.** (2016) RNAi-mediated soybean

- mosaic virus SMV) resistance of a Korean soybean cultivar. *Plant Biotechnol. Rep.* **10**, 257-267.
- Kim HJ, Kim MJ, Pak JH, Jung HW, Choi HK, Lee YH, et al.** (2013) Characterization of SMV resistance of soybean produced by genetic transformation of *SMV-CP* gene in RNAi. *Plant Biotechnol. Rep.* **7**, 425-433.
- Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO, Lee IC, Sheen J, Nam HG and Hwang I** (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 814-19.
- Kim MJ, Kim HJ, Pak JH, Cho HS, Choi HK, Jung HW, et al.** (2017) Overexpression of *AtSZF2* from *Arabidopsis* showed enhanced tolerance to salt stress in soybean. *Plant Breed. Biotech.* **5**, 1-15.
- Kim MJ, Kim JK, Kim HJ, Pak JH, Lee JH, Kim DH, et al.** (2012) Genetic modification of the soybean to enhance the  $\beta$ -carotene content through seed-specific expression. *PLoS One* **7**, e48287.
- Koch E, Slusarenko A** (1990) Arabidopsis is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *Plant Cell* **2(5)**, 437-45.
- Kwon TM, Kim HJ, Yun SY, Kim JB, Cho HS, Nam JS, Chung YS** (2017) Enhancement of syringin contents in soybean seeds with seed-specific expression of a chimeric *UGT72E3/E3* gene. *Plant Biotech Reports* **11**, 439-447
- Lee DH, Lee IC, Kim KJ, Kim DS, Na HJ, Lee IJ, Kang SM, Jeon HW, Le PY, Ko JH** (2014) Expression of gibberellin 2-oxidase 4 from *Arabidopsis* under the Control of a Senescence-associated Promoter Results in a Dominant Semi-dwarf Plant with Normal Flowering. *J. Plant Biol.* **57**, 106-116
- Lee KH, Seo PJ** (2017) Coordination of matrix attachment and ATP-dependent chromatin remodeling regulate auxin biosynthesis and *Arabidopsis* hypocotyl elongation. *PLoS ONE* **12(7)**, e0181804.
- Li DY, Inoue H, Takahashi M, Kojima T, Shiraiwa M and Takahara H** (2008) Molecular characterization of a novel salt-inducible gene for an OSBP (oxysterol-binding protein)-homologue from soybean. *Gene* **407**, 12-20
- Li G, Hall TC, Holmes-Davis R** (2002) Plant chromatin: development and gene control. *BioEssays* **24**, 234-243.
- Li X, Gan R, Li P, Ma Y, Zhang L, Zhang R, Wang Y and Wang NN** (2006) Identification and functional characterization of a leucine-rich repeat receptor-like kinase gene that is involved in regulation of soybean leaf senescence. *Plant Mol Biol* **61**, 829-44
- Lichtenthaler H and Wellburn AR** (1983). Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* **603**, 591-93.
- Lim PO and Nam HG** (2005) The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in *Arabidopsis*. *Curr Top Dev Biol* **67**, 49-3.

- Lim PO, Kim Y, Breeze E, Koo JC, Woo HR, Ryu JS, Park DH, Beynon J, Tabrett A, Buchanan-Wollaston V and Nam HG** (2007) Overexpression of a chromatin architecture-controlling AT-hook protein extends leaf longevity and increases the post-harvest storage life of plants. *The Plant Journal* **52**, 1140-1153.
- Lim PO, Woo HR and Nam HG** (2003) Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **8**, 272-78.
- Malik MA, Cheema MA, Khan HZ and Wahid MS** (2006) Growth and yield response of soybean (*Glycine max L.*) to seed inoculation and varying phosphorus levels. *J Agric Res* **44**(1), 47-54
- Manavalan LP, Guttikonda SK, Tran LSP, Nguyen HT** (2009) Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant Cell Physiol.* **50**, 1260-1276.
- Matsushita A, Furumoto T, Ishida S and Takahashi Y** (2007) AGF1, an AT-hook protein, is necessary for the negative feedback of AtGA3ox1 encoding GA 3-oxidase. *Plant Physiol* **143**, 1152-1162.
- Nam HG** (1997) Molecular genetic analysis of leaf senescence. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 200-07.
- Oh SA, Lee SY, Chung IK, Lee CH and Nam HG** (1996) A senescence-associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Molecular Biology* **30**, 739-753
- Oh, SA, Park, JH, Lee, GI, Paek, KH, Park, SK and Nam, HG** (1997) Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **12**, 527-535.
- Oksman-Caldentey KM, Hiltunen R** (1996) Transgenic crops for improved pharmaceutical products. *Field Crops Res.* **45**, 57-69.
- Otegui MS, Noh YS, Martı́nez DE, Vila Petroff MG, Staehelin LA, Amasino RM and Guamet JJ** (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of *Arabidopsis* and soybean. *The Plant Journal* **41**, 831-844
- Pak JH, Oh JS, Kim HJ, Kim MJ, Choi HK, Jung HW, Kang KH, Jeong JU, Chung YS** (2013) Development of Near-isogenic Transgenic Rice Lines Harboring wild Rice (*Oryza grandiglumis*)-derived Fungal Resistance Gene (*OgPRI*). *Plant Breed. Biotech.* **1**(2), 122-130
- Paz MM, Martinez JC, Kalvig AB, Fonger TM, Wang K** (2006) Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep.* **25**, 206-213.
- Sgarra R, Lee J, Tessari MA, Altamura S, Spolaore B, Giacotti V, Bedford MT and Manfioletti G** (2006) The AT-hook of the chromatin architectural transcription factor high mobility group A1a is arginine-methylated by protein arginine methyltransferase 6. *J Biol Chem* **281**, 3764-3772.
- Street IH, Shah PK, Smith AM, Avery N and Neff MM** (2008) The AT-hook-containing proteins SOB3/AHL29 and ESC/AHL27 are negative modulators of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *Plant*



*J* **54**, 1-14.

**Strick R and Laemmli UK** (1995) SARs are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein. *Cell* **83**, 1137–1148.

**Su Y, Kwon CS, Bezhani S, Huvermann B, Chen C, Peragine A, Kennedy JF, and Wagner D** (2006) The N-terminal ATPase AT hook-containing region of the *Arabidopsis* chromatin-remodeling protein SPLAYED is sufficient for biological activity. *Plant J* **46**, 685–699.

**Subramaniam R, Desveaux D, Spickler C, Michnick SW, and Brisson N** (2001) Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nat. Biotechnol.* **19**, 769-772.

**Subramaniam S, Shahani N, Strelau J, Laliberte C, Brandt R, Kaplan D and Unsicker K** (2005) Insulin-Like Growth Factor 1 Inhibits Extracellular Signal-Regulated Kinase to Promote Neuronal Survival via the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase A/c-Raf Pathway. *The Journal of Neuroscience* **25(11)**, 2838-852

**Sun J, Jiang H, Xu Y, Li H, Xie Q and C Li** (2007) The CCCH-Type Zinc Finger Proteins AtSZF1 and AtSZF2 Regulate Salt Stress Responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **48(8)**, 1148–158 (2007)

**Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y and Collinge DB** (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barleypowdery mildew interaction. *Plant J* **11**, 1187–194

**Xiao C, Chen F, Yu X, Lin C, Fu YF** (2009) Over-expression of an AT-hook gene, AHL22, delays flowering and inhibits the elongation of the hypocotyl in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **71**, 39-50.

**Zeng P, Vadnais DA, Zhang Z, Polacco JC** (2004) Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Rep.* **22**, 478-482.

**Zhao J, Bai W, Zeng Q, Song S, Zhang M, Li X, Hou L, Xiao Y, Luo M, Li D, Luo X, Pei Y** (2015) Moderately enhancing cytokinin level by down-regulation of *GhCKX* expression in cotton concurrently increases fiber and seed yield. *Mol Breeding* **35**, 60

**남홍길, 김진희, 우혜련** (2005) 식물 잎 수명 조절 단백질, 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2005-0079892 (출원인; 포항공대, 제노마인(주))

**이동희, 김국진, 이인철** (2010) 식물의 수명 연장 기능 및 스트레스 내성 기능을 가지는 GSDL2 단백질, 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2010-0030394, (출원인; 제노마인(주))

**이동희, 김국진, 이인철, 김동수** (2010) 식물체의 노화지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATHG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2010-0010652 (출원인; 제노마인(주))

- 이동희, 이인철, 김국진 (2011) 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2011-0038932, (출원인; 제노마인(주))
- 이동희, 이인철, 김국진, 김동수 (2011) 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG7 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2011-0038929, (출원인; 제노마인(주))
- 이동희, 이인철, 김국진, 김동수, 박경목 (2011) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG4 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2011-0110593, (출원인; 제노마인(주))
- 이동희, 이인철, 김국진, 김동수, 박경목 (2012) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG3 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2012-0016951 (출원인; 제노마인(주))
- 이동희 등 (2013) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG6 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2013-0075018 (출원인; 제노마인(주))
- 이동희 등 (2013) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG10 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2013-0075022 (출원인; 제노마인(주))
- 이동희 등 (2014) *ORE7* 유전자를 이용한 식물 생산성 증대 방법, 식물 스트레스 내성 강화 방법 및 식물 노화 지연 방법 (기여도 30%), 대한민국 특허출원 10-2014-0132324 (출원인; 제노마인(주))
- 이동희 등 (2015) 식물의 왜화 유도 기능을 가진 폴리펩티드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 용도. 대한민국 특허등록 10-1556927 (기여도 100%), 3차년도
- 이동희 등 (2016) 식물의 생산성 증대 기능과 노화 지연 기능을 갖는 MtATPG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2016-0129693
- 이동희 등 (2016) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 MtATPG2 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2016-0129696
- 이동희 등 (2017) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 AHL26 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2017-0168525

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

			코드번호	D-15	
과제번호			112124-5		
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야	식량작물 유전자원·육종		과제구분	단위	
사업명	농생명산업기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	Chromatin architecture 조절기술을 통한 다수성 콩 형질전환체 개발		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	제노마인(주)		연구책임자	이 동 희	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2012. 12. 21 - 2013. 12. 20	280,000	94,000	374,000
	2차년도	2013. 12. 21 - 2014. 12. 20	280,000	94,000	374,000
	3차년도	2014. 12. 21 - 2015. 12. 20	280,000	94,000	374,000
	4차년도	2015. 12. 21 - 2016. 12. 20	280,000	94,000	374,000
	5차년도	2016. 12. 21 - 2017. 12. 20	280,000	94,000	374,000
	계	2012. 12. 21 - 2017. 12. 20	1,400,000	470,000	1,870,000
참여기업					
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018. 03. 20

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
제노마인(주)	연구소장	이 동 희

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	
-----	--

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구개발 목표:

신규 유용 유전자 6종 발굴, 다수성 농업형질( $\geq 120\%$  종자수확량) 우량 형질전환체 2종 개발

연구개발 결과:

신규 유용 유전자 14종 발굴, 다수성 농업형질( $\geq 135\%$  종자수확량) 우수계통(event) 9종 개발

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

Chromatin architecture 조절기술을 통한 다수성 형질 관련 유용 유전자는 다수성 및 생산성 증대 형질의 제공에 있어서 폭넓은 식물 스펙트럼을 가지므로 타 경제작물 개발에도 적용이 가능하리라 기대된다.

본 사업을 통해 개발된 다수성 농업 형질을 나타내는 우수계통은 이후 안정성 평가 등의 GM 실용화 연구를 통하여 다수성 GM 콩 품종 개발하고자 하며 이러한 다수성 GM 콩 품종 개발은 다국적기업의 최근 종자개발 전략과 일치하므로 해외 진출에 있어 많은 장점을 가질 수 있을 것이다.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

Chromatin architecture 조절기술을 통한 다수성 형질 관련 유용 유전자는 농업형질의 우수성 때문에 유용 유전자의 기술이전에 있어서 보다 부가가치를 높일 것이다. 또한 상기 유전자는 다수성 및 생산성 증대 형질의 제공에 있어서 폭넓은 식물 스펙트럼을 가지므로 타 경제작물 개발에도 적용이 가능하리라 기대된다.

본 사업을 통해 개발된 다수성 농업 형질을 나타내는 우수계통은 이후 안정성 평가 등의 GM 실용화 연구를 통하여 다수성 GM 콩 품종 개발에 적용하고자 한다. 개발되는 다수성 GM 콩 품종은 벡터 및 유전자에 대한 지적소유권 확보로 특허에 대한 문제점을 최소화할 수 있어 작물의 실용화에 유익하게 활용할 수 있을 것이다.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제의 연구기간내 연구개발 수행 내용에 대한 정성적 연구개발실적 대부분이 100% 이상을 달성하였으며, 이를 통하여 정량적 연구개발 실적 또한 대부분 100% 이상의 목표 달성도를 가져 연구개발 수행노력의 성실도는 아주우수 등급으로 판단됨

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구개발성과 목표: 논문 게재 3건(SCI급), 특허출원/등록 15건  
 연구개발성과 실적: 논문 게재 6건(SCI급 3건), 특허출원/등록 16건, 학술대회 발표 6건

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중(%)	달성도(%)	자체평가
<b>다수성 형질 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정</b> - 기 확보된 유전자 4종에 대한 기능 재검정 - 신규 유용 유전자 6종 발굴 및 기능 검정 - 기확보 및 신규 유용 유전자 10종에 대한 콩 형질전환용 벡터 construct 제작 - 특허회피 벡터 construct 제작 및 형질전환체 기능 분석	40	>100	<b>다수성 형질 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정</b> - 기 확보된 유전자 4종에 대한 기능 재검정 - 신규 유용 유전자 14종 발굴 및 기능 검정 - 기확보 및 신규 유용 유전자 14종에 대한 콩 형질전환용 벡터 construct 제작 - 특허회피 벡터 pCSENIIF vector construct 제작 및 형질전환체 기능 분석
<b>콩 형질전환체 생산 및 개발</b> - 기확보 및 신규 유용 유전자 10종에 대한 형질전환 및 형질전환체 생산 - 생산된 콩 형질전환체 7종 이상에 대한 기능 분석 - 다수성 농업 형질( $\geq 120\%$ 종자수확량)을 지닌 우량 콩 형질전환체 2종 개발 - 특허회피 벡터 construct를 도입한 형질전환체 기능 및 표현형 검정 확인	40	>100	<b>콩 형질전환체 생산 및 개발</b> - 기확보 및 신규 유용 유전자 14종에 대한 형질전환 및 형질전환체 생산 - 생산된 콩 형질전환체 8종 이상에 대한 기능 분석 - 다수성 농업 형질( $\geq 135\%$ 종자수확량)을 지닌 우량 콩 우수계통 9종 개발 - pCSENIIF 벡터 construct를 도입한 형질전환체 기능 및 표현형 검정 확인
<b>지적소유권 확보</b> - 15건의 특허 출원/등록 - 3건의 SCI급 학술지 게재	20	>100	<b>지적소유권 확보</b> - 16건의 특허 출원/등록 - 6건의 학술지 게재 (SCI급 3건)
합계	100점	>100	



### Ⅲ. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

연구개발 결과의 정성적, 그리고 정량적 목표에 대하여 100% 이상의 목표달성도를 가져 전체적으로 연구개발결과가 아주 우수한 것으로 판단됨.

#### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

#### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

Chromatin architecture 조절기술을 통한 다수성 형질 관련 유용 유전자는 다수성 및 생산성 증대 형질의 제공에 있어서 폭넓은 식물 스펙트럼을 가지므로 타 경제작물 개발에도 적용이 가능하리라 기대된다. 본 연구팀은 상기 유전자를 콩뿐만 아니라 국화, 잔디 등에도 도입하여 생산성 증대 농업형질을 가지는 우수 품종 개발에 적용하고자 한다.

본 사업을 통해 개발된 다수성 농업 형질을 나타내는 우수계통은 이후 안정성 평가 등의 GM 실용화 연구를 통하여 다수성 GM 콩 품종 개발을 수행하고자 한다. 이러한 연구 진행은 장기적 관점에서 수행되어야 하므로 후속 국책과제 또는 국내 기업과의 공동연구를 통하여 진행하고자 한다. 이러한 저력은 다국적기업의 최근 종자개발 전략과 일치하므로 해외 진출에 있어 많은 장점을 가질 수 있을 것이다.

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.